

Keringő mikroRNS-ek változása hormonális hatásokra és lehetséges biológiai jelentőségük

Doktori értekezés

Dr. Igaz Iván

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Pós Zoltán, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sági Zoltán, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kiss András, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Gundy Sarolta, Ph.D., osztályvezető

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	5
1.1. A mikroRNS-ek általános jellemzői	5
1.2. A mikroRNS-ek élettani és patogenetikai szerepe	9
1.3. A mikroRNS-ek szerepe daganatokban: onkogének és tumor szupresszorok	11
1.4. A keringő mikroRNS-ek, lehetséges diagnosztikai jelentőségük és élettani funkcióik	16
1.5. A hormonok hatásai a mikroRNS-ek kifejeződésére	19
2. CÉLKITŰZÉSEK	21
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
3.1. Egészséges egyének keringő mikroRNS mintázatának bioinformatikai elemzése	22
3.2. Betegek és hormonvizsgálatok	23
3.3. RNS izolálás a plazmamintákból	26
3.4. Kvantitatív valós idejű reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-qPCR)	24
3.5. Sejtvonala és in vitro kezelések, és molekuláris vizsgálatok	28
3.6. Statisztikai módszerek	29
4. EREDMÉNYEK	30
4.1. Egészségesek mikroRNS-profiljának vizsgálata	30
4.2. Keringő mikroRNS-ek változása a Dexametazon és ACTH-tesztek során	35
5. MEGBESZÉLÉS	38
5.1. Az egészséges egyénekben kimutatható keringő mikroRNS-ek lehetséges szerepe. A tumor szupresszor mikroRNS-ek relatív túlsúlya a keringő mikroRNS-ek között és egy új hipotézis – keringő mikroRNS-ek, mint a tumorképződés gátlói? (tumor surveillance?)	38
5.2. Néhány további hipotézisünk a keringő, testfolyadékokban kimutatható	

mikroRNS-ek biológiai jelentőségével kapcsolatban	45
5.3 A testfolyadékba jutó mikroRNS-ek az egyének és fajok közötti kommunikációban	47
5.4 A mikroRNS-ek változásai Dexametazon és ACTH kezelésre, és összevetésük irodalmi adatokkal, illetve a <i>miR-27a</i> változásának esetleges jelentősége	49
6. KÖVETKEZTETÉSEK	52
7. ÖSSZEFOGLALÁS	53
8. SUMMARY	54
9. IRODALOMJEGYZÉK	55
10. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	75
11. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	76
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	77

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACC: mellékvesekéreg carcinoma (adrenocorticalis carcinoma)

ACTH: adrenocorticotrop hormon

AGO 1-4: Argonauta fehérje 1-4

AMI: akut miokardiális infarktus

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

BCL-2: B-sejtes leukémia (B-cell leukemia)

CK: kreatin kináz (creatine kinase)

CLL: krónikus limfoid leukémia (chronic lymphoid leukemia)

C-MYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog

CT: ciklus küszöbérték (cycle threshold)

dCT: normalizált ciklus küszöbérték (delta cycle threshold)

DNS: dezoxiribonukleinsav

dsRNS: kettős szálú RNS (double stranded RNA)

EDTA: etilén diamin tetraecetsav

ETS: E26 transformation-specific (transzkripció faktor)

ETT-TUKEB: Egészségügyi Tudományos Tanács – Tudományos és Kutatásetikai Bizottság

FBS: magzati marhaszérum (fetal bovine serum)

FXS : Törékeny X Szindróma (Fragile-X-Syndrome)

GEO: Gene Expression Omnibus

hCG: humán choriogonadotropin

HDL: high-density lipoprotein

let7: lethal-7 (mikroRNS)

mRNS: hírvivő ribonukleinsav (messenger RNA)

miRNS, miR: mikroRNS

Nr3c1: sejtmagi receptor alcsalád 3, csoport C, 1. tagja (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1)

PCOS: policisztás ovárium szindróma

PDK-1: 3' foszfoinozítid-függő protein kináz-1 (3' Phosphoinositide- Dependent Protein Kinase-1)

POL2: RNS-polimeráz-2

POL3: RNS-polimeráz-3

qRT-PCR: kvantitatív valós idejű (real-time) reverz transzkripció polimeráz láncreakció (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

Ran-GTPáz: RAs-related Nuclear protein-guanosine 5'-triphosphatase

RIN: RNS integritási szám (RNA Integrity Number)

RISC: RNS-indukált csendesítő komplex (RNA induced silencing complex)

RNS: ribonukleinsav

RNSi: RNS interferencia

RT: reverz transzkripció

SNP: egyedi/egy pontos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

SR-BI: scavenger receptor class B, type I

siRNS: kis interferáló RNS (small interfering RNA)

TLR8: Toll-szerű receptor 8 (Toll-like receptor 8)

TP53: tumor protein 53

TRBP: TAR RNS-kötő fehérje (TAR RNA binding protein)

3' UTR: 3' nem transzlálódó régió (3' untranslated region)

5' UTR: 5' nem transzlálódó régió (5' untranslated region)

ZO-1: zona occludens 1

1. BEVEZETÉS

1.1 A mikroRNS-ek általános jellemzői

A mikroRNS-ek fehérjét nem kódoló, érett formájukban egyláncú, 17-25 nukleotidból álló RNS-molekulák, amelyek a növények és az állatok génjeinek poszttranszkripció szabályozásában vesznek részt. A hírvivő (messenger) RNS-ek (mRNS) 3' végéhez kötődve a cél mRNS-ek translációjának gátlását vagy lebomlását segítik elő, ezáltal a RNS interferencia (RNSi) endogén mediátorainak tekinthetők (Bartel 2009).

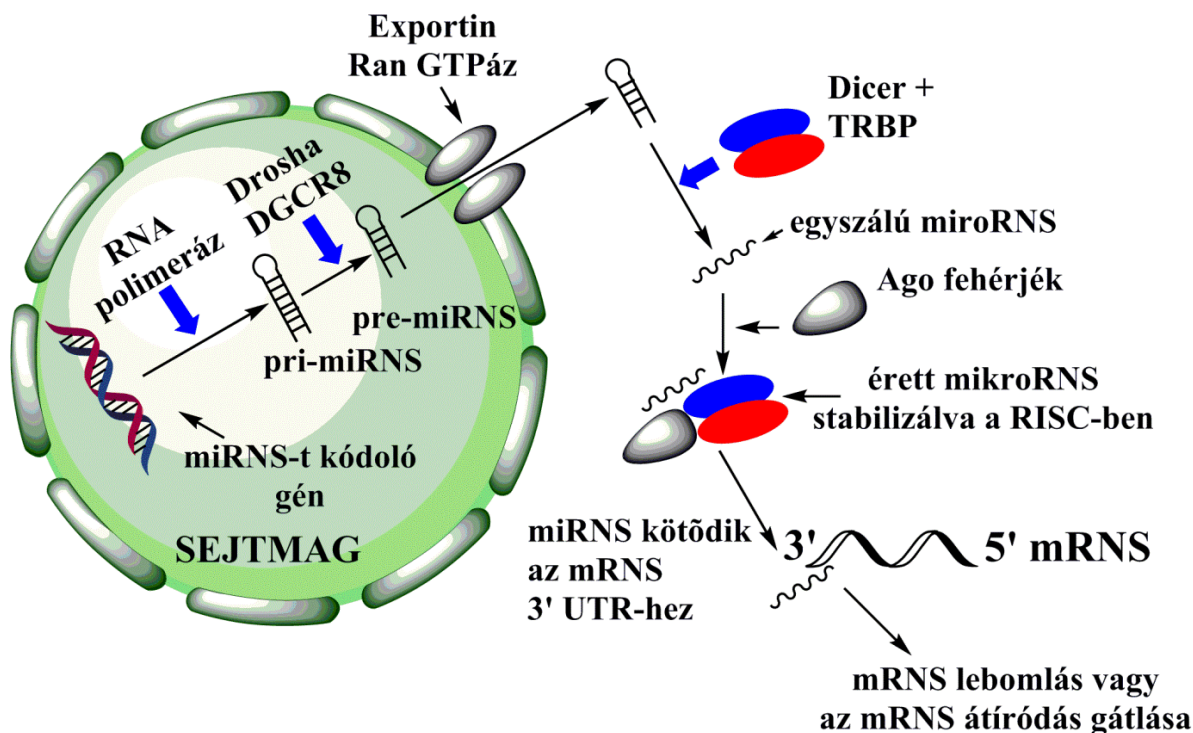
Az RNS interferencia jelensége (RNSi) először *kívülről bejuttatott* kétszálú (double stranded) RNS-ekből (dsRNS) keletkező RNS lebomlásként vált ismertté (Fire és mtsai 1998). A *kívülről bejuttatott*, exogén RNS-ekből ún. rövid interferáló (short interfering) RNS-ek (siRNS) képződnek, amelyek cél mRNS-eikhez specifikusan kötődni képesek, azok lebomlását idézve elő. Az siRNS-ek úgy jönnek létre, hogy az RNS nukleázok (RNáz III családjába tartozó Dicer) megkötik a dsRNS-eket és 21-25 nukleotid hosszúságú darabokra (RNS fragmens, siRNS) hasítják. A hasítás során a siRNS 5' végén foszfátcsoport, a 3' végén 2 - 3 nukleotidnyi „túllógás” (overhang) alakul ki.

Ezt követően az siRNS-ek belépnek az úgynevezett RNS indukálta csendesítő komplexbe (RNA-induced silencing complex, RISC), amely egy több alegységből álló ribonukleoprotein komplex. Itt történik az siRNS-el homológ mRNS-ek specifikus gátlása, illetve lebomlása, oly módon, hogy a RISC aktiválódása után (amely egy ATP függő folyamat) az siRNS szálai szétesavarodnak, az antiszensz szál specifikusan kötődik a vele komplementer mRNS-hez, majd az aktivált RISC feldarabolja azt (Nicholson 1999).

A későbbi kutatások nyomán ismertté vált, hogy ez a folyamat nemcsak *kívülről bevitt* RNS-ek útján, hanem a genomban külön gének által kódolt (endogén) mikroRNS-ek révén is megvalósulhat (He és mtsai 2004). A mikroRNS-eket első ízben *Ambros* és *Ruvkun* írták le (Lee és mtsai 1993, Wightman és mtsai 1993).

A kis interferáló RNS-ek (siRNS) és a mikroRNS-ek érési folyamatai számos hasonlóságot mutatnak. A mikroRNS-ek a kódoló génekről a RNS-polimeráz segítségével íródnak át (Bartel 2004). A transzkripció folyamatában döntő szerepet az *RNS-polimeráz-2 (POL2)* játszik, felmerült ugyanakkor a gén elhelyezkedésétől függően az *RNS-polimeráz-3 (POL3)* szerepe is (Faller és mtsai 2008, Borchert és mtsai 2006).

A transzkripció során egy hajtúkanyar szerkezetű, megközelítőleg 1 kilobázis hosszúságú prekursor molekula képződik, egy kettősszálú primer mikroRNS (primikroRNS). A hajtúkanyar bázisánál elhelyezkedő hélixszerkezetet ismeri fel a RNáz III aktivitású *Drosha* enzimből és RNS-kötő fehérjékből álló komplex, amely a primikroRNS hasítását követően egy mikroRNS prekursor (pre-mikroRNS) molekulát szabadít fel (Filipowicz és mtsai 2008, Bartel 2004, Faller és mtsai 2008). Ezt követően a pre-mikroRNS-ek aktív transzporttal jutnak a sejtmagból a citoplazmába. Az aktív transzport folyamatáért a Ran-GTPáz aktivitású *Exportin-5* felelős (Filipowicz és mtsai 2008, Bartel 2004, Faller és mtsai 2008). Az így már a citoplazmában található pre-mikroRNS-t az RNáz III aktivitású enzim, a *Dicer* és annak kofaktora (*TAR RNA binding protein = TRBP*) tovább hasítja, kivágva belőle a terminális hurkot. Az így keletkező mikroRNS duplex az úgynevezett mikroRNS indukált csendesítő komplexbe (miRISC) épül be (Filipowicz és mtsai 2008) (**1. ábra**).



1. ábra: A mikroRNS-ek képződésének sematikus ábrázolása

A következő lépésben a miRNS-t helikáz aktivitású enzimek kicsavarják, szétválasztják, az 5'-3' irányú vezérszál stabilizálódik, majd a vele komplementer 3'-5' irányú szál lebomlik. Az így keletkező 20-24 nukleotid hosszúságú RNS molekula az miRISC-ben stabilizálódik, és érett mikroRNS-ként funkcionál (Bartel 2004, Faller és mtsai 2008).

A mikroRNS-ek a hírvivő RNS-ekhez (messenger-RNS) kapcsolódva fejtik ki hatásukat, azok poszttranszkripciós gátlását eredményezve. Ennek keretében a mikroRNS-ek általi génexpressziós szabályozás az epigenetikai szabályozás körébe tartozik, mivel a génexpresszió szabályozását a nukleotidsorrend megváltoztatása nélkül éri el.

A poszttranszkripcionális gátlás folyamatában kiemelkedő szerepe van az úgynevezett *Argonauta fehérjéknek* (AGO), amelyeknek emlősökben négy altípusa (AGO1-4) ismert (Filipowicz és mtsai 2008). A mikroRNS-kötőhelyek típusosan az mRNA molekulák 3' UTR (3' nem transzlálódó) régiójában találhatók, ahol általában több kötőhely is előfordul. Amennyiben azok részleges vagy teljes komplementaritást mutatnak az adott mikroRNS-sel, a mikroRNS-ek miRISC-vel alkotott működési egysége ezeket a szekvenciákat felismeri és megköti.

A mikroRNS-t kötő régiók és a mikroRNS-ek között a növényekben tökéletes komplementaritás áll fenn, állatokban és emberben azonban a komplementaritás csak részleges (Filipowicz és mtsai 2008). Lokalizációjuk szerint a mikroRNS-eket kódoló gének lehetnek intra- vagy intergénikusak (Sevignani és mtsai 2006). Leggyakrabban (70%-ban) a fehérjét kódoló gének intronikus szakaszain helyezkednek el, 30%-uk a fehérjét nem kódoló, intergénikus régiókban a fehérjét kódoló génektől távol található, ezek független transzkripciós egységet alkotnak. A mikroRNS gének előfordulhatnak egymás közelében klasztereket képezve, illetve egymástól különállóan, önálló transzkripciós egységet alkotva (Sevignani és mtsai 2006, Baskerville, Bartel 2005).

Emberben a legutóbbi (www.mirbase.org, 2014 június 21. release) adatbázis adatok szerint 2688 mikroRNS ismert. A mikroRNS-t kódoló gének az ismert gének 1-3%-át teszik ki, mindazonáltal ez a szám folyamatos növekedést mutat (Bentwich és mtsai 2005). Becslések szerint a humán genomban a fehérjét kódoló gének körülbelül 30-60 %-a állhat mikroRNS szabályozás alatt (Malumbres 2013, Berezikov és mtsai 2005, Griffith és mtsai 2008).

A mikroRNS-ekre jellemző a pleiotropia jelensége. A pleiotropia révén egy mikroRNS molekula több száz, akár több ezer mRNS-t is szabályozhat, másrésről egy mRNS molekula több mikroRNS célpontjaként szolgálhat, amelyek gyakran szinergisztikusan hatnak (Lewis és mtsai 2005). A mikroRNS-eket kódoló gének kifejeződése (expressziója) ugyanakkor egy adott szervezetben belül szövet-, illetve sejtspecifikus (Chen 2005), sőt a mikroRNS-ek hatása is szövetspecifikus, azaz ugyanaz a mikroRNS különböző szövetekben különböző mRNS célpontokhoz kapcsolódhat.

A mikroRNS-ek mRNS-hez való kötődését számos tényező befolyásolja. Amíg növényekben tökéletes bázispárosodás jön létre a mikroRNS és az azt kötő nukleotid szekvencia között (Rhoades és mtsai 2002), addig állatokban és az emberben ez egy sokkal összetettebb folyamat, és részleges komplementaritás jellemző. Emlősökben a mikroRNS-ek a cél mRNS molekulák 3' nem kódoló régiójában (UTR, untranslated region) található miRNS-kötő "site"-hoz kapcsolódnak és a kötődés részleges bázis komplementaritás esetén is létrejön (He és mtsai 2004). A mikroRNS gátló hatását jelentős mértékben meghatározza a mikroRNS 5' vége és az mRNS között kialakuló bázis kötődések száma. A mikroRNS-ek 5' végéhez közel fekvő 8 nukleotidpárt tartalmazó régiót seed (mag) régióknak nevezik (Lewis és mtsai 2003).

Attól függően, hogy a kötődés a seed mely régiójában történik, a kiváltott poszttranszkripció gátlás mértéke különböző, ezt hívjuk a seed-ek hierarchiájának. A seed régióhoz közel fekvő nukleotidszekvenciák is módosítják a mikroRNS-ek hatásait. Az ebben a régióban található magas adenin- és uraciltartalom, illetve a "seed" régió körül eső egy vagy több nukleotidot érintő mismatchek jelenléte a poszttranszkripció gátlást erősíti.

A kötőhely (site) elhelyezkedése is befolyásolja a mikroRNS-ek hatását. Amennyiben a "site" a 3' UTR bármely végéhez közel helyezkedik el, az a mikroRNS hatását fokozza (Grimson és mtsai 2007). Amennyiben az mRNS-en több különböző mikroRNS-t kötő hely található, és ezek egymástól kevesebb, mint 30 nt távolságra helyezkednek el a mikroRNS-ek kötődése egymás hatását erősíti (Hon, Zhang 2007).

A mikroRNS célmolekulák azonosítására különböző bioinformatikai módszereket fejlesztettek ki, de tekintettel arra, hogy ezek a módszerek prediktív jellegűek, a célmolekulák (targetek) *in silico* azonosítása után, biológiai jelentőségük validálása céljából az interakciók további kísérletes alátámasztására van szükség. A target predikció során különféle matematikai algoritmusokkal részleges, illetve teljes bázis komplementaritást mutató mikroRNS kötő helyeket keresnek a humán genomban.

A target predikciós algoritmusokkal egy adott mikroRNS potenciális célpontjainak listája a kalkulált valószínűségi "score" értékekkel együtt lekérdezhető. A legelterjedtebb alkalmazások (például PicTar, TargetScan, miRBase) az interneten szabadon hozzáférhetők.

1.2 A mikroRNS-ek élettani és patogenetikai szerepe

A mikroRNS-ek az összes fehérjét kódoló gén mintegy 30-60 %-ának befolyásolásával számos élettani folyamatban szerepet játszanak, mint a sejtek differenciálódása, migrációja, proliferációja, illetve a programozott sejthalál (apoptózis) szabályozása. Szerepük van ezen kívül az ontogenezis folyamataiban, az intermedier anyagcsere szabályozásában, az immunrendszer működésében, illetve a szervezet homeosztázisának fenntartásában is (Filipowicz és mtsai 2008).

A mikroRNS-ek kifejeződésének megváltozása számos kórkép kialakulásában kulcsfontosságú. Az alábbiakban néhány példát mutatok be a mikroRNS-ek

kifejeződésének változására különböző betegségekben. A szívizomsejtek mitokondriumainak ATP szintézisében (Nishi és mtsai 2010) például a *miR-15b*, a *miR-16*, a *miR-195* és a *miR-424* a celluláris ATP szint csökkentésére képes.

A mikroRNS-ek fontos szerepet töltenek be az érett idegsejtek funkcióinak fenntartásában is. A *miR-134* hozzájárul az idegsejtek közötti szinapszisok kifejlődéséhez és éréséhez, csökkent kifejeződését figyelték meg Alzheimer kórban, Törékeny (Fragile)-X-Szindrómában (FXS) és autizmusban szenvedő betegekben (Sempere és mtsai 2004). A *miR-133b* az agy dopaminerg neuronjainak érését szabályozza, Parkinson szindrómás betegek esetén csökkent kifejeződést találtak (Smirnova és mtsai 2005).

A mikroRNS-ek a belső elválasztású mirigyek működésében is részt vesznek. A hasnyálmirigy fejlődéséért és az inzulinszekrécióért egyaránt felelős *miR-375*-ről igazolódott, hogy közvetlenül befolyásolja a 3' Foszfinozidid dependens protein kináz-1 (PKC-1) működését, ezáltal csökkenti a glükóz inzulin génkifejeződésre gyakorolt stimuláló hatását (El Ouaamari és mtsai 2008).

A mikroRNS-ek egyértelmű patogenetikai szerepe az utóbbi évek intenzív kutatásának köszönhetően bizonyossá vált többek között a gyulladós bélbetegségek (Kalla és mtsai 2015), egyes autoimmun kórképek (Luo és mtsai 2010, O'Connell és mtsai 2010), illetve az atherosclerosis esetében (Urbich és mtsai 2008).

A mikroRNS-ek daganatképződésben betöltött szerepe a mikroRNS-kutatás egyik legintenzívebb területe. A mikroRNS-ek a karcinogenezis szinte valamennyi állomását befolyásolják (sejtnövekedés, differenciálódás, proliferáció, invázió, apoptózis, angiogenezis és metasztázisképzés) (Negrini és mtsai 2009). A mikroRNS-ek megváltozott kifejeződésének a kemoterápiával szembeni rezisztencia kialakulásában is jelentőséget tulajdonítanak (Zhang és mtsai 2013, Liang és mtsai 2009).

A daganatos szövetben fokozott kifejeződést mutató mikroRNS-eket onkogén (onkomiR), míg a csökkent kifejeződésűeket tumor szupresszorsupresszor mikroRNS-eknek nevezzük, a klasszikus onkogén-tumor szupresszor megkülönböztetést követve (Chen 2005).

A rosszindulatú daganatok közül először CLL-ben (krónikus limfoid leukémia) írták le a mikroRNS-ek (*miR-15*, *miR-16*) megváltozott expresszióját (Calin és mtsai 2002). Ezt követően számos más daganatban igazolódott a mikroRNS-ek szerepe. A *let-*

7 tumor szupresszor mikroRNS család több tagjának csökkent kifejeződése a RAS onkogének fokozott aktivitásán keresztül szerepet játszik a tüdőrák patogenezisében (Johnson és mtsai 2005). A *miR-145* onkogén hatását írták le metasztatizáló vastagbél-tumor esetében (Arndt és mtsai 2009). A mikroRNS-ek megváltozott kifejeződését gyomorrákban (Wu és mtsai 2010), az urogenitális traktus malignus daganataiban, és emlőrákban is megfigyelték (Catto és mtsai 2011, Takahashi és mtsai 2015), illetve az endokrin daganatok közül a mikroRNS-ek pajzsmirigy (Forte és mtsai 2015) és mellékvese daganatokban betöltött szerepéről is széleskörű ismereteink vannak.

A daganatok patogenezisében betöltött szerepük mellett azonban a mikroRNS-ek, mint potenciális biomarkerek a daganatok diagnózisában is fontosak, mivel a jó- és rosszindulatú daganatokra eltérő mikroRNS mintázat jellemző. Különösen nagy lehet a jelentőségük azon tumorok diagnózisában, ahol a jó- és rosszindulatúság megállapítása hisztológiai diagnózissal nehézkes (például pajzsmirigy follicularis adenoma és carcinoma elkülönítése (Weber és mtsai 2006)), illetve mellékvesekéreg-daganatok esetében (Tömböl és mtsai 2009).

A mikroRNS-ek nemcsak a rosszindulatúság megállapításának elősegítőiként, hanem prognosztikus markerként is szóba jönnek több daganat, így mellékvesekéreg carcinoma esetében is (Özata és mtsai 2011).

1.3 A mikroRNS-ek szerepe daganatokban: onkogének és tumor szupresszorok

Amint arról az általános részben szó volt, a mikroRNS-ek a következő klasszikus dichotómiát követik: a tumoros szövetekben fokozott kifejeződéssel rendelkező mikroRNS-eket onkogén mikroRNS-eknek (vö: onkomir), amíg a csökkent kifejeződésűeket tumor szupresszor mikroRNS-eknek nevezzük.

Mind az onkogén, mind a tumor szupresszor mikroRNS-ek célpontjai között nagy számban található a sejtek szaporodásának, differenciálódásának, illetve apoptózisának szabályozásában szereplő mRNS-ek. Tekintettel arra, hogy a mikroRNS-ek hatása nem közvetlen, hanem a cél mRNS-ek kifejeződésének szabályozásán keresztül valósul meg, az onkogén mikroRNS-ek célpontjai között tumor szupresszor hatású mRNS-ek, illetve fordítva, a tumor szupresszor hatású mikroRNS-ek célpontjai

között onkogén mRNS-ek fordulnak elő. A daganatokra jellemző onkogén mikroRNS-ek fokozott kifejeződése így csökkenti a tumor szupresszor mRNS-ek kifejeződését, míg a csökkent kifejeződésű tumor szupresszorok gátlása alól felszabaduló onkogén mRNS-ek kifejeződése fokozódik, ami összességében a daganat növekedését segítheti (Chen 2005).

A mikroRNS-ek deregulációjának már a tumorgenezis kezdeti fázisában kimagasló a jelentősége (Cortez és mtsai 2011), valamint a mikroRNS-ek megváltozott kifejeződését már a tumort körülvevő hisztológiai szempontból ép szövetben is ki lehet mutatni, például pajzsmirigy papilláris carcinoma esetében (He és mtsai 2005).

A mikroRNS gének körülbelül 50 %-a a kromoszómák - tumoros szövetekben gyakran károsodott - fragilis régióiban található (Calin és mtsai 2004), ami ismét arra utal, hogy a mikroRNS-ek és a daganatképződés között szoros kapcsolat áll fenn.

Jó példa az onkogén hatású mikroRNS-ekre az elsők között felfedezett *mir-17-92* cluster, amely hat mikroRNS-t kódol (*miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-19b*, *miR-20a*, *miR-92*), amelyeknek a kifejeződése szolid tumorokban és számos malignus hematológiai betegségben fokozott (He és mtsai 2005, Mendell 2008). A *mir-17-92* kifejeződését szignifikánsan emelkedettnek találták többek között tüdőrákban (különösen kissejtes tüdőrákban) és malignus limfómákban, különös tekintettel annak B sejtjes formáira (Hayashita és mtsai 2005).

MYC transzgenikus egerekben a *miR-17-92* cluster hemopoetikus sejtekbe történő bevitelével gyors limfóma kialakulást lehetett elérni (He és mtsai 2005), ami ahhoz a megfigyeléshez vezetett, hogy bizonyos mikroRNS változások a sejteket mintegy hajlamosítják a rákos elfajulásra, illetve a mikroRNS-ek megváltozott kifejeződése nem pusztán a malignus átalakulás következménye, hanem oki tényező. A *miR-17-92 cluster* onkogén hatása így igazolást nyert, ezért azt *Oncomir-1*-nek nevezték el.

Bioinformatikai úton számos génről kimutatták, hogy a *miR-17-92* célpontjaiként szolgálnak: a cluster két tagja, a *miR-19a* és a *miR-20* több mint 600 gént befolyásolnak (Krek és mtsai 2005).

A mikroRNS-ek onkogenezis szempontjából jelentős másik csoportját a tumor szupresszor mikroRNS-ek képezik. Ezek a mikroRNS-ek a tumorok képződését azáltal

gátolják, hogy blokkolják/csökkentik a sejtek malignus transzformációjáért felelős onkogének működését.

A tumor szupresszor mikroRNS-ek patológiai jelentőségét először krónikus limfoid leukémiában írták le, ahol a *miR-15* és a *miR-16* csökkent kifejeződésére derült fény (Calin és mtsai 2002) Mindkét mikroRNS (*miR-15*, *miR-16*) célpontja az apoptotikus *BCL-2* (B-cell leukemia 2), csökkent kifejeződésük a *BCL-2* növekedett kifejeződését okozva fokozott sejtproliferációt eredményez (Cimmino és mtsai 2005, Aqeilan és mtsai 2010).

További példaként a *let-7* családba tartozó mikroRNS-eket hoznám fel, melynek célgénjei (például a *MYC*, a *CCND1*, a *RAS*, a *LIN28* és a *HMGGA2*) olyan onkogének, amelyek a sejtciklus progressziójáért felelősek. Alacsony *let-7* szinteket találtak számos primer és metasztatikus daganatban, amelyet a daganatok fokozott agresszivitásával hoztak összefüggésbe (Nair és mtsai 2012). A *let-7* családhoz tartozó mikroRNS-ek alacsony kifejeződését írták le tüdőrákban, amely a betegség stádiumától függetlenül rövidebb posztoperatív túléléssel járt együtt (Takamizawa és mtsai 2004). A *let-7* gén tumor szuppresszív hatásának vizsgálatára *let-7* géneket juttattak be tüdő adenocarcinoma sejtvonalba és azt figyelték meg, hogy a *let-7* gátolja a tüdőrák sejteinek növekedését *in vitro* (Takamizawa és mtsai 2004). Jelenlegi ismereteink szerint a *let-7* egyik célgénje a *RAS* onkogén, melynek a kifejeződését csökkenti (Johnson és mtsai 2005). Tüdőrák esetén a szignifikánsan alacsonyabb *let-7* kifejeződés szignifikánsan magasabb RAS fehérjeszinttel jár együtt, amely arra utal, hogy a *let-7* onkogén funkcióját a *RAS* általi szabályozás útján tölti be a tüdőrák onkogenezisében. Fontos hangsúlyozni, hogy a fent részletezett klasszikus dichotómiát a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatása tovább bonyolítja. Ugyanaz a mikroRNS az egyik szövetben tumor szupresszor hatással bír, amíg a másik szövetben onkogén hatást fejt ki. A *miR-503* kifejeződése például mellékvesekéreg carcinomában magasabb (Tömböl és mtsai 2009), amíg hipofízistumorokban alacsonyabb kifejeződést mutat (Butz és mtsai 2010). A mikroRNS-ek szövetspecifikus viselkedése a daganatok mikroRNS alapú terápiájának egyik legnagyobb akadályát képezheti.

A mikroRNS-ek kifejeződését transzkripciós faktorok befolyásolják, amelyek ugyanakkor mikroRNS-ek támadáspontjai is lehetnek. Érdekes szabályozó körök

keletkeznek ezáltal, például a *c-MYC* protoonkogént, a *miR-17-5p*-t, a *miR-20a*-t és a *E2F1* transzkripciós faktort magába foglaló hálózat.

A *miR-17-92* mikroRNS génkomplex és a *c-Myc* gén kifejeződése között érdekes kölcsönhatás van, mivel mindkettő a sejtciklusban szerepet játszó transzkripciós faktor, az *E2F1* kifejeződését szabályozza (O'Donnell és mtsai 2005). A *c-Myc* a legjobban ismert onkogének közé tartozó transzkripciós faktor, amely az összes humán gén csaknem 15 %-ának befolyásolásával a sejtek proliferációját, növekedését szabályozza és részt vesz a programozott sejthalál (apoptózis) szabályozásában is (Fernandez és mtsai 2003).

A *TP53* (tumor protein 53) egy másik jelentős transzkripciós faktor, amelynek mennyisége tumoros szövetekben gyakran csökkent. Mivel a *TP53* a döntően tumor szupresszor hatású *miR-34a* transzkripcióját indukálja, a *TP53* hiánya nagy valószínűséggel összefügg a csökkent *miR-34a* kifejeződésével, illetve a megnövekedett sejtproliferációval (He és mtsai 2007). A *miR-34a* kifejeződését egy *TP53*-tól független út is befolyásolja: az *ETS* családhoz tartozó transzkripciós faktorról, az *ELK1*-ről kimutatták, hogy onkogének által indukált öregedésben serkenti a *miR-34a* kifejeződését (Christoffersen és mtsai 2010).

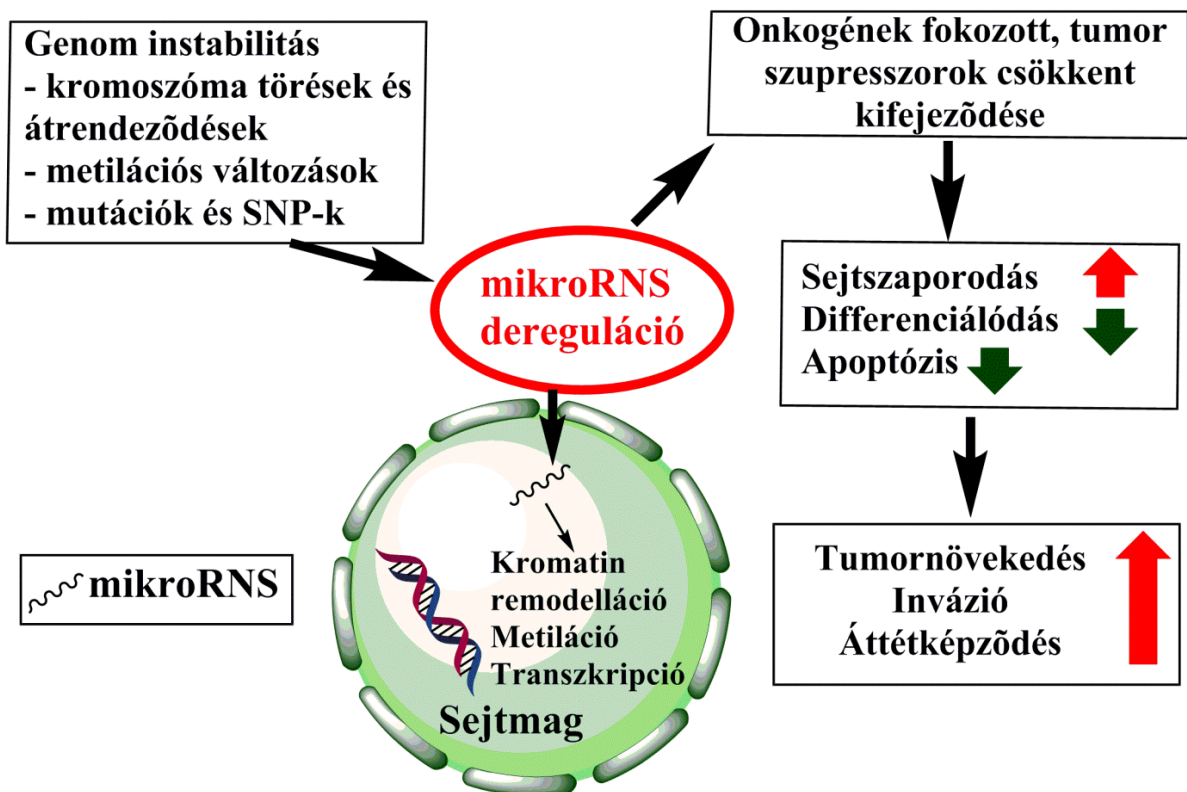
A tumorképződés szempontjából fontos mikroRNS expressziós zavarok kialakulásában kimagasló jelentősége van bizonyos mutációknak, kromoszóma eltéréseknek, metilációs változásoknak, illetve a SNP-knek (single nucleotide polymorphism, egy nukleotidot érintő polimorfizmus). **(2. ábra)**

Tekintettel arra, hogy a mikroRNS és az mRNS összekapcsolódása a klasszikus bázispárosodás szabályai szerint megy végbe, akár a mikroRNS-ben, akár az azt felismerő szekvenciában történő genetikai változás (mutáció) a mikroRNS hatását befolyásolhatja (Ryan és mtsai 2010). Az első mikroRNS gént érintő mutációt egy családi halmozódást mutató krónikus limfoid leukémia esetében írták le, ahol a pri-miR-16 szekvenciát befolyásoló mutáció a tumor szupresszor hatás kiesése nyomán vezetett daganatképződéshez (Calin és mtsai 2005).

A SNP-k a mutációkhoz képest jóval gyakrabban fordulnak elő (hozzávetőlegesen a genom minden 1000. nukleotidjában). A mikroRNS-ekben és a célszekvenciáikban megjelenő változások gyakran megjelennek a rosszindulatú daganatokban (Ryan és mtsai 2010) és befolyásolhatják azok kemoterápiás szerekekkel

szembeni válaszkészségét is. Ezenkívül a SNP-k a mikroRNS-ek biogenezisére is hatással vannak, illetve egy adott személy SNP profilja a mikroRNS expressziós profilt is befolyásolhatja (Ryan és mtsai 2010).

A sejtek citoplazmájában a klasszikus mikroRNS-mRNS kapcsolódásán keresztül végbemenő folyamaton túl, újabb eredmények arra utalnak, hogy a mikroRNS-ek egyéb alapvető funkciókkal is rendelkeznek. A mikroRNS-ek a gének transzkripcióját közvetlenül a sejtmagban befolyásolhatják (Salmanidis és mtsai 2014), illetve egyéb epigenetikai útvonalakra (például kromatin remodelling, metiláció) is hatással vannak (Malumbres 2013).



2. ábra: A mikroRNS-ek szabályozási zavara és a daganatképződés összefüggései

A fenti példákon keresztül a génexpresszió szabályozásának különböző szereplői közötti komplex kölcsönhatásokat is szerettem volna bemutatni. A sejtciklus finomhangolásán kívül alapvető sejt szintű folyamatok épülnek ezekre az interakciókra, és a malignus folyamatokra ezen kifinomult kölcsönhatások kisiklása jellemző.

1.4 A keringő mikroRNS-ek, lehetséges diagnosztikai jelentőségük és élettani funkcióik

A szöveti mikroRNS-ek mellett újabb adatok arra utalnak, hogy a mikroRNS-ek a testfolyadékokban is jelen vannak. Az extracelluláris térben található mikroRNS-ek kimutatása, vizsgálata, illetve potenciális biomarkerként történő használata napjainkban intenzív kutatás tárgya.

Az egyik első közlemény, amely keringő mikroRNS-ekkel foglalkozik *Chim és mtsai* nevéhez fűződik. Ez a munkacsoport keringő mikroRNS-eket (*miR-141*, *miR-149*, *miR-299-5p*, *miR-135b*) mutatott ki terhes nők szérumban, melyeknek szintje a szülést követően lecsökkent (*Chim és mtsai 2008*). Később mikroRNS-ek jelenlétét figyelték meg diffúz nagy B-sejtes limfómában szenvedő betegek szérumban. Az egészséges kontrollokhoz képest a *miR-155*, a *miR-21* és a *miR-210* szintjét találták emelkedettnek (*Lawrie és mtsai 2008*). Előrehaladott prosztatákban szenvedő betegek esetében a keringő *miR-141* magasabb szintjét tapasztalták, ezzel elsőként rámutatva arra, hogy a keringő mikroRNS-ek malignus daganatok potenciális biomarkereiként szolgálhatnak (*Mitchell és mtsai 2008*).

MikroRNS-ek jelenlétét mutatták ki vérben, nyálban, anyatejben, spermában, vizeletben, illetve székletben is (*Gilad és mtsai 2008*, *Reid és mtsai 2011*).

A mikroRNS-ek alapvetően három mechanizmus útján kerülnek az extracelluláris térbe: (I) a károsodott szövetekből passzív úton gyulladás vagy nekrosis nyomán, illetve aktív szekrécióval (II) membrán vezikulumokba csomagolva (exoszómák, mikrovezikulumok, apoptotikus testek) történő aktív transzport útján, valamint (III) makromolekuláris komplexekben Argonaute (Ago) fehérjékhez vagy high-density lipoprotein (HDL) partikulumokba történő aktív transzport útján (*Redis és mtsai 2012*). Az extracelluláris mikroRNS-ek stabilitását a membránképletek (mikrovezikulák, exoszómák), illetve makromolekuláris komplexeik biztosítják. Ezek a mikroRNS-ek külső hatásokkal szemben (hő- és pH változások, ribonukleáz enzim) meglehetősen stabilak (*György és mtsai 2011*, *Valadi és mtsai 2007*).

A vérben keringő mikroRNS-ek minimálisan invazív biomarkerként történő felhasználása számos betegség esetében felmerült, beleértve a malignus tumorokat is

(Allegra és mtsai 2012, Jarry és mtsai 2014), ugyanakkor a betegségek kialakulásában, potenciális etiológiai tényezőként való esetleges szerepük egyelőre nagyrészt tisztázatlan.

Komoly kérdés, hogy a testfolyadékokban szereplő mikroRNS-ek csak melléktermékek-e, vagy biológiai funkciójuk is van. A keringő mikroRNS-ek jelentékeny része vérésejtekből származik (Pritchard és mtsai 2012). Mindazonáltal még melléktermékeként is komoly diagnosztikus jelentőségük lehet. Tekintettel arra, hogy a keringő mikroRNS-ek a szövetekből származva az eredeti szövet géneexpressziós mintázatát jelzik, az ún. liquid (folyadék) biopszia egyik fő komponensét képezhetik.

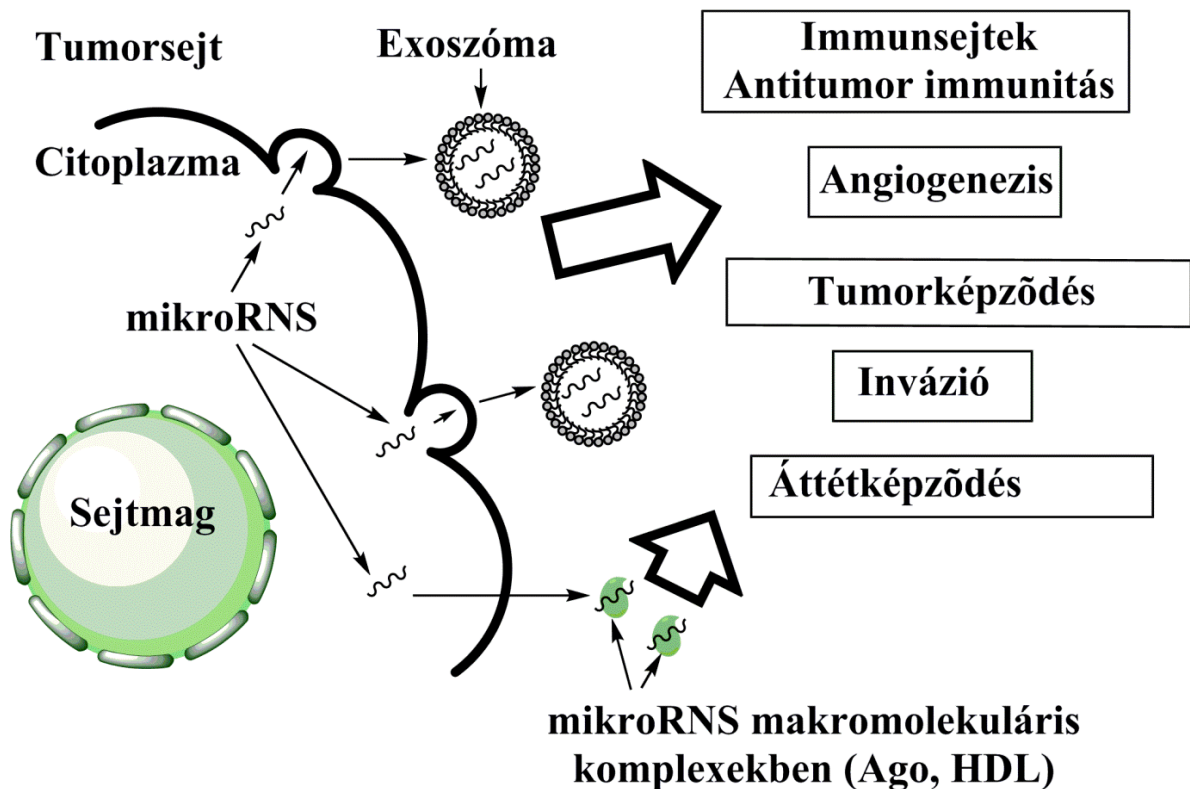
A keringő mikroRNS-ek diagnosztikai alkalmazására számos példa ismert. Ezek közül az AMI (Akut Myocardialis Infarktus) esetén a keringő *miR-208a* fokozott kifejeződése fontos diagnosztikus hatással bírhat, szintje az akut kardiális eseményt követő 4 órán belül megemelkedett (Wang és mtsai 2010). A *miR-499* fokozott kifejeződését találták AMI-ben, azonban iszkémiás szívbetegségben a szintje nem emelkedett (Adachi és mtsai 2010). Szignifikáns összefüggést igazoltak a keringő *miR-208b* és *miR-499* szintek és a szérum Troponin, illetve CK (Creatin kináz) szintje között AMI-ban szenvedő betegek esetén (Corsten és mtsai 2010).

A keringő mikroRNS-ek a mellékvesekéreg daganatok korai, preoperatív diagnózisában, mint minimálinvazív biomarkerek jöhetnek szóba. A *miR-483-5p* magasabb szintjét írták le agresszív ACC esetén, amíg a daganat nem agresszív formájában alacsonyabb *miR-195* szintet találtak, ezzel felvetve azt, hogy ez a két mikroRNS az ACC két formájának (agresszív és nem agresszív) elkülönítésében szerepet játszhat (Chabre és mtsai 2013). Munkacsoportunk eredményei is támogatják ez irányú alkalmazásukat, a *miR-100*, a *miR-181b*, a *miR-184* és a *miR-210* fokozott kifejeződését igazoltuk ACC-ben szenvedő betegek plazmájában (Szabó és mtsai 2014). Patel és mtsai a *miR-34a* alacsonyabb szintjét állapították meg (Patel és mtsai 2013), mindazonáltal a fenti keringő mikroRNS-ek alacsony specificitásuk és szenzitivitásuk miatt a klinikai gyakorlatban a malignitás elbírálására jelenleg még nem alkalmasak.

Feltételezve, hogy a keringő mikroRNS-ek biológiai jelentősége van, ezek epigenetikai információt közvetítő endokrin, illetve parakrin mediátoroknak tekinthetők, amennyiben a szekretáló sejttől távol eső sejtek géneexpresszióját képesek befolyásolni

(Cortez és mtsai 2011). A membrán vezikulumok képesek áthatolni a sejtek membránján, és megváltoztathatják más sejtek génexpressziós mintázatát (Redis és mtsai 2012). A tumoros sejtek által szecernált mikroRNS-ek a tumor sejtek közötti kommunikációért lehetnek felelősek, elősegíthetik az angiogenezist, a tumorinváziót, illetve a metasztázisképzést is (Taylor, Gercel-Taylor 2013, Ma és mtsai 2012) (**3. ábra**). Az irodalomban elsőként *Valadi* és *mtsai* közölték, hogy a sejtek exoszómákon keresztül genetikai információ átadására lehetnek képesek (Valadi és mtsai 2007), azóta ebben a tárgyban számos közlemény született (Kogure és mtsai 2011, Chiba és mtsai 2012).

A sejtek által kibocsátott exoszómákban a mikroRNS-ek távoli sejtekhez is eljuthatnak, és azok működését alapvetően kétféle módon befolyásolhatják.



3. ábra: A daganatból származó mikroRNS-ek lehetséges kórélettani jelentősége

Az egyik mechanizmus a klasszikus utat jelenti, a mikroRNS-ek célgénjeiken keresztül változtatják azok kifejeződését, például az emlőrák sejtvonalak által termelt *miR-105* csökkenti a *ZO-1* (*zona occludens 1*) gén kifejeződését, amely a sejtadhézió szabályozásának zavarán keresztül a daganat áttétképződését segíti elő (Zhou és mtsai

2014). A második, eddig kevésbé feltérképezett út egyfajta parakrin jelleget képvisel, mivel ebben az esetben a tumorsejtek által kiválasztott *miR-21* és *miR29a* a környező immunsejtek *TLR8* (*Toll-like receptor 8*) receptorához kötődik, majd azokat aktiválva a sejtekben olyan citokinek termelődését váltja ki, amelyek a malignus sejtek proliferációját fokozzák (Fabbri és mtsai 2012, Fabbri és mtsai 2013).

A keringő mikroRNS-ek daganatképződésben betöltött szerepe mellett felmerül az a kérdés is, hogy az egészséges egyéneknél kimutatható keringő mikroRNS-eknek mi lehet az élettani szerepe. Munkám első részében az egészségesekben kimutatható keringő mikroRNS-ek esetleges daganatképződést gátló aktivitását elemeztem.

1.5 A hormonok hatásai a mikroRNS-ek kifejeződésére

A mikroRNS-ek kifejeződését szabályozó tényezőket kevésbé ismerjük, és e tekintetben külön kérdésként merül fel a hormonok esetleges szerepe a mikroRNS-ek kifejeződésének szabályozásában.

A mikroRNS-ek szerepe a szteroidhormon-termelő sejtekben és szövetekben még nem teljesen tisztázott. A legtöbb közlemény a petefészek granulosa sejtjeiben történő szteroidfüggő folyamatokkal foglalkozik (Fiedler és mtsai 2008, Sirotkin és mtsai 2009, Yao és mtsai 2010, Zhang és mtsai 2013). Egér petefészek granulosa sejtekben hCG (humán choriogonadotropin) adása előtt, illetve után vizsgálták a mikroRNS mintázatot. A vizsgált 212 mikroRNS közül a *miR-132* és a *miR-212* magasabb expresszióját figyelték meg hCG adását követően, az irodalomban elsőként bizonyítva, hogy a petefészek granulosa sejtjeiben hormonindukcióra (hCG) mikroRNS expressziós változások történnek (Fiedler és mtsai 2008).

Később patkány granulosa sejt kultúrán végzett vizsgálatokkal 31 olyan mikroRNS-t azonosítottak, amelyeknek a kifejeződése FSH mediált progeszteron szekréció során megváltozott (Yao és mtsai 2010).

Szintén állatkísérletes modellben mutatták ki, hogy a szteroidszintézis koleszterin-szubsztrátját szállító SR-BI (scavenger receptor class B, type I) két mikroRNS (*miR-125a*, *miR-455*) szabályozása alatt áll (Hu és mtsai 2012). Ugyanez a

munkacsoport ACTH-val (adrenokortikotropin), 17a-E2-vel (ösztadiol) és Dexametazonnal kezelt patkányok mellékveséjének vizsgálata során a kontroll (hormonnal nem kezelt) csoportéhoz képest bizonyos mikroRNS-ek megváltozott kifejeződését írta le. ACTH hatására a *miR-212*, a *miR-182*, a *miR-183*, a *miR-132* és a *miR-96* magasabb, míg a *miR-466b*, a *miR-214*, a *miR-503* és a *miR-27a* alacsonyabb kifejeződést mutatott. 17a-E2 kezelés hatására a *miR-212*, a *miR-183*, a *miR-182*, a *miR-132*, a *miR-370*, a *miR-377* és a *miR-96* magasabb, ezzel szemben a *miR-125b*, a *miR-200b*, a *miR-122*, a *miR-466b*, a *miR-138*, a *miR-214*, a *miR-503* és a *miR27a* alacsonyabb kifejeződését tapasztalták. A Dexametazon kezelés csökkentette a *miR-200b*, a *miR-122*, a *miR-19a*, a *miR-466b* és a *miRNA27a* szintjét, azonban a *miR-183* szintje emelkedett (Hu és mtsai 2013).

Policisztás ovárium szindrómában (PCOS-ben), illetve obesitas-ban is végeztek vizsgálatokat: a keringő *miR-21*, *miR-27b*, *miR-103* és *miR-155* kifejeződését vizsgálták. Obesitasban a *miR-21*, a *miR-27b* és a *miR-103* szintjét szignifikánsan alacsonyabbnak találták, ugyanakkor PCOS esetén ezek a mikroRNS-ek magasabb koncentrációban voltak kimutathatók (Murri és mtsai 2013).

Egér mellékvesében *in vivo* vizsgálták az ACTH stimuláció mikroRNS mintázatra gyakorolt hatását. Négy olyan mikroRNS-t találtak (*miR-96*, *miR-101a*, *miR-142-3p*, *miR-433*), amelyek ACTH stimuláció hatására fokozott kifejeződést mutattak, ezzel párhuzamosan a glükokortikoid receptor (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 - Nr3c1) szintjének emelkedése is kimutatható volt (Riester és mtsai 2012).

Tekintettel arra, hogy a mellékvesetumorok kivizsgálásában a Dexametazon szuppressziós teszt és az ACTH stimulációs teszt széles körben használatosak, felmerül a kérdés, hogy ezen tesztek során a keringő mikroRNS-ek szintjében milyen változás áll be, különös tekintettel a malignus folyamatok elkülönítésére javasolt biomarkerek szintjére. Munkám második részében a Dexametazon és ACTH a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely működésében szerepet játszó keringő mikroRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatását vizsgáltuk *in vivo* emberben, tudomásunk szerint a világon először.

2. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során a keringő mikroRNS-ek lehetséges diagnosztikai és biológiai szerepét vizsgáltam. Első lépésben az egészséges egyénekből jelenlevő keringő mikroRNS poolt térképeztem fel, míg a munkám második részében arra kerestem a választ, hogy a laboratóriumi diagnosztikában rutinszerűen alkalmazott vizsgálatok közül a hormonstimulációs tesztek befolyásolhatják-e egy konkrét betegség esetében kimutatható keringő mikroRNS-ek szintjét.

Két célkitűzést fogalmaztam meg:

1. Egészséges egyének keringő mikroRNS kifejeződési mintázatának elemzése során bioinformatikai és irodalmi eredmények felhasználásával arra kerestem a választ, hogy a keringő tumor szupresszor mikroRNS-eknek lehet-e tumor felügyeleti (tumor surveillance) aktivitása
2. Keringő mikroRNS-ek kifejeződését befolyásolják-e a klinikai gyakorlatban alkalmazott, a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengelyt befolyásoló hormontesztek (Dexametazon szuppresszió és ACTH-stimuláció)? Ezek között a mellékvesekéreg-carcinoma diagnózisában ígéretes keringő mikroRNS-ek kifejeződését is vizsgáltuk, hiszen esetleges változásuk hormonhatásokra alkalmazásuk gátja lehetne.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Egészséges egyének keringő mikroRNS mintázatának bioinformatikai elemzése

Metaanalízis keretében a Gene Expression Omnibus adatbázisból (GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) 5 adatállományt töltöttünk le (GSE25609, GSE53179, GSE39833, GSE41922 és GSE50867) összesen 61 egészséges egyén keringő mikroRNS expressziós adataival.

A mikroRNS-eket kifejeződési értékük alapján rangsoroltuk és a 20 legmagasabb kifejeződést mutatót, a 20.-hoz viszonyítva fejeztük ki. Az adatok feldolgozását és elemzését saját JAVA programnyelvben kifejlesztett programokkal végeztük. A mikroRNS-ek klinikai jelentőségeihez a PubMed adatbázisból származó adatokat is elemeztünk (www.pubmed.org).

3.2 Betegek és hormonvizsgálatok

A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján 10 hirzutizmus, hipertónia, illetve mellékvesekéreg incidentalóma miatt vizsgált betegeknél Cushing kór gyanúja miatt végeztünk kis dózisú (1 mg) egy éjszakás (overnight) Dexametazon szuppressziós tesztet.

Másik 10 betegnél mellékvesekéreg elégtelenség (Addison kór), illetve kongenitális adrenális hiperplázia (21-hidroxiláz defektus) gyanúja miatt ACTH stimulációs tesztet végeztünk, 250 mikrogramm tetracosactide (Cosyntropin, Sandoz Inc.) adásával. Ezen betegek gyengeség, szekunder oligomenorrhea, infertilitás vagy hirzutizmus miatt kerültek vizsgálatra.

Az éhomi kortizolszint meghatározására reggel 07:00 és 09:00 óra között vérvételre került sor. A Dexametazont betegeink este 11:00 órakor vették be, az azt követő reggel 07:00 és 09:00 óra között került sor az újabb vérvételre.

A 250 mikrogramm tetracosactide bevitelét követően 1 órával került sor vérvételre. A vizsgálatok eredményei alapján a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely funkcionális zavara mind a húsz esetben kizárható volt.

A vizsgálat elvégzését az ETT-TUKEB engedélyezte (engedélyszám: 499/2013).

A betegek adatait az **1. táblázat** tartalmazza.

1. Táblázat**A betegek adatai****A. Dexametazon teszt**

Beteg N°	Nem F/N	Életkor (év)	Betegség/a vizsgálat indikációja	Kiindulási plazma kortizol (µg/dl)	kortizol (µg/dl) 1 mg Dex adását követően
1	N	73	obezitás	12,6	1,6
2	N	30	obezitás, hirsutizmus	19,5	0,5
3	F	65	obezitás	10,7	0,9
4	F	45	hipertónia	17,4	0,9
5	N	61	obezitás, hipertónia	9,4	1,6
6	N	68	mellékvesekéreg incidentalóma	13,5	1,8
7	F	65	mellékvesekéreg incidentalóma	25,6	1,7
8	F	68	mellékvesekéreg incidentalóma	19,4	1,7
9	F	59	mellékvesekéreg incidentalóma	17,6	1,8
10	N	20	obezitás	20,0	1,3

B. Tetracosactid-teszt

Beteg száma	Nem F/N	Életkor (év)	Betegség/a vizsgálat indikációja	Kiindulási plazma kortizol (µg/dl)	Kortizol 250 µg tetracosactid után (µg/dl)
1	N	30	sec. amenorrhoea	14,4	35,8
2	N	46	mellékvesekéreg elégtelenség gyanúja	6,6	20,7
3	N	36	gyengeség	13,4	31,4
4	N	23	raromenorrhoea	16,3	33,9
5	N	36	infertilitás	7,2	29,5
6	N	37	sec. amenorrhoea	14,2	35,4
7	N	34	raromenorrhoea	26,0	35,7
8	N	23	hirzutizmus	16,0	32,3
9	F	60	mellékvesekéreg elégtelenség gyanúja	15,4	28,0
10	N	23	infertilitás	11,0	34,4

3.3 RNS izolálás a plazmamintákból

EDTA-val alvadásgátolt vérmintákat gyűjtöttünk, ezt lecentrifugáltunk (3000 rpm, 20 percig, 4 °C-on) majd a plazmát külön csőbe gyűjtve folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és további felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A plazma felolvasztását követően spike-in kontrollként 5 µl 5 nM Syn-cel-mir-39 miScript miRNA Mimic (Applied Biosciences) került hozzáadásra, illetve az RNS oszlop kötés-hatékonyságának növelése céljából 2 µl glikogént (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA), majd 200 µl kloroformot adtunk az oldathoz. Alapos összekeverést követően az oldatot 3 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Centrifugálást követően a felső vízdékony réteget gyűjtőcsőbe pipettáztuk és 900 µl 100%-os etanolt adtunk hozzá.

Az így keletkezett oldatot RNeasy Mini spin oszlopokra vittük és előírás szerint tisztítottuk (Qiagen GmbH, Hilden, Németország). A végleges RNS oldat térfogata 32 µl volt. A kinyert RNS koncentrációjának mérése NanoDrop 1000 Spectrophotometerrel történt (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) minden mintában, az RNS mennyiségét és minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tech. Inc., Santa Clara, CA, USA) segítségével határoztuk meg (Eukaryote RNA Pico Chip). Az RNS-t további használatig -80 °C fokon tároltuk.

3.4 Kvantitatív valós idejű reverz transzkripció polimeráz lánreakció (RT-qPCR)

A RT-qPCR vizsgálatokhoz első lépésben 10 ng teljes RNS-ből TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével a gyártó által megadott protokollnak megfelelően 15 µl végtérfogatban cDNS-t szintetizáltunk. A ciklusok a következők voltak: 30 perc 16 °C, 30 perc 42 °C, 5 perc 85 °C, majd hűtés 4 °C –ra.

A következő lépésben a qRT-PCR reakciót TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems) felhasználásával, 20 µl végtérfogatban állítottuk össze a gyártó által adott előírásoknak megfelelően. A hőprogram a következő volt: 50 °C – 2 perc, enzimaktiválás 95 °C - 10 perc, 40 PCR ciklus történt, denaturálás 95 °C – 15 másodperc, majd 60 °C - 60 másodperc. A mintákat 96-lyukú plate-n, 7500 Fast Real-Time PCR System készüléken amplifikáltuk az előírt hőmérsékletértékek és időtartamok mellett. Minden minta esetén három párhuzamos mérést végeztünk.

A következő, specifikus primereket és próbákat tartalmazó assay-eket használtuk: *hsa-miR-27a* (000408), *hsa-miR-200b* (002251), *hsa-miR-214* (002306), *hsa-miR-483-5p* (002338), *hsa-miR-503* (001048), referenciaként/belső kontrollként a *cel-miR-39-t* (000200) használtuk (Mitchell és mtsai 2008).

3.5 Sejtvonala és *in vitro* kezelések, molekuláris vizsgálatok

Az *NCI-H295R* mellékvesekéreg carcinoma sejtvonala az American Tissue Type Culture Collection-ből szereztük be és DMEM tápfolyadékban tenyésztettük. A hormonmentes magzati marhaszérumot (hormone-free fetal bovine serum, FBS) a következők szerint készítettük elő: 0,1 gramm dextranszal bevont szént (C6241, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) adtuk 6 ml FBS-hez, majd 4 °C fokon inkubáltuk 24 órán keresztül. Ezt követően az oldatot 10 percen keresztül centrifugáltuk 3000g-vel, majd a felülúszót 0.22 mikronos filteren keresztül szűrtük át. Ezt követően 2,5 %-os hormonmentes FBS használatával a sejteket 6 lyukú lemezekre ülepítettük.

A következő napon 24 órás széruméheztetéssel szinkronizáltuk a sejteket, majd ismét 24 óra múlva 2,5 %-os hormonmentes FBS-t adtuk 100 nM Dexametazon (DEX) jelenlétében. 8 órás inkubációt követően a sejteket és a felülúszót kinyertük, majd a teljes RNS-t miRNeasy Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) felhasználásával izoláltuk. A Dexametazon kezelést négy alkalommal megismételtük.

A teljes RNS-t a sejtekből és a tenyésztőfolyadékból miRNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével vontuk ki a gyártó előírásainak megfelelően a munkacsoport korábbi munkájának megfelelő módosításokkal (Butz és mtsai 2011). Az RNS koncentrációját NanoDrop 1000 Spectrophotometer-rel mértük meg (Thermo Fisher Scientific Inc.). A RIN számokat Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tech. Inc., Santa Clara, CA, USA) segítségével határoztuk meg. Az RNS-t felhasználásig -80°C-on tároltuk. A valós idejű PCR reakciót Taqman miRNA Assays-k (Applied Biosystems) felhasználásával végeztük specifikus primerekkel. Az RT-qPCR reakció paraméterei a plazmán végzett vizsgálatokéval megegyeznek (*hsa-miR-27a* (000408). Referencia mikroRNS-ként itt is a *cel-miR-39* (000200) szolgált (Mitchell és mtsai 2008).

3.6 Statisztikai módszerek

A szignifikáns kifejeződést mutató mikroRNS-ek azonosításához a Shapiro-Wilks normalitás teszt eredményétől függően Student vagy Mann-Whitney tesztet használtunk munkacsoportunk korábbi munkájának statisztikai elemzését követve (Szabó és mtsai 2014). Szignifikancia határt $p < 0.05$ -ben húztuk meg. Az expressziós adatokat a ΔCt -vel jellemeztük, ahol a magasabb ΔCt alacsonyabb, míg az alacsonyabb ΔCt fokozott kifejeződést jelent. Az RT-qPCR adatok statisztikai elemzését Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Egészségesek mikroRNS-profiljának vizsgálata

Kutatásunk során az egészséges egyének vérmintáiban leggyakrabban előforduló mikroRNS-ek *in silico* analízisét végeztük el. Metaanalízis keretében a Gene Expression Omnibus adatbázisból (GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) 5 adatállományt töltöttünk le (GSE25609, GSE53179, GSE39833, GSE41922 és GSE50867) összesen 61 egészséges egyén keringő mikroRNS expressziós adataival. A fenti öt tanulmányból négy ázsiai népesség adatait tartalmazza. A mikroRNS-eket kifejeződési értékük alapján rangsoroltuk és a 20 legmagasabb kifejeződést mutatót, a 20.-hoz viszonyítva fejeztük ki. A vizsgált öt kutatásból négy esetben a *hsa-miR-451* emelhető ki (59-szeres emelkedés) (**2. Táblázat**). Emellett szakirodalmi adatokat tanulmányoztunk.

Egészséges egyének keringő mikroRNS profiljának vizsgálata során a korábban részletezett adatok felhasználásával szérum és plazma mintákban több mint 270 mikroRNS-t észleltünk. Ezen mikroRNS-ek kifejeződése a különböző vizsgálatokban meglehetősen különbséget mutatott (Reid és mtsai 2011). A különböző kutatócsoportok „nyers” eredményeit összehasonlítva néhány mikroRNS-ről egyértelműen kimondható, hogy az átlagnál nagyobb mértékben fejeződnek ki (Reid és mtsai 2011).

A szakirodalomban és saját bioinformatikai vizsgálatunkban a vérben a 20 legmagasabb kifejeződésű mikroRNS-t elemeztük, kifejeződésük mértékét a 20. legmagasabb kifejeződést mutató mikroRNS-hez viszonyítottuk, Reid és mtsai megközelítését követve (Reid és mtsai 2011). Egy önkényes határvonalat felhasználva (a rangsorban 20. leggyakoribb mikroRNS-hez viszonyított legalább 10-szeres kifejeződés) a szakirodalomban közölt mikroRNS-ek közül a *hsa-miR-451* (106-szor magasabb kifejeződés a rangsorbeli 20.-hoz képest) (Chen és mtsai 2008), a *hsa-miR-223* (11-338-szoros) (Mitchell és mtsai 2008, Hunter és mtsai 2008), a *hsa-miR-16* (11-20-szoros) (Chen és mtsai 2008, Hunter és mtsai 2008) és a *hsa-let-7f* (16-szoros) (Mitchell és mtsai 2008) érdemelnek külön figyelmet.

A *Weber és mtsai* által közölt tanulmányban a három legmagasabban rangsorolt mikroRNS közül kettő, a *hsa-miR-335* és a *hsa-miR-377* (*Weber és mtsai 2010*) szintén említésre érdemesek, azonban a különböző plazma mikroRNS-ek relatív túlsúlya ebben a tanulmányban nem szerepel.

A *hsa-miR-223* és a *hsa-miR-16* három tanulmányban szerepel úgy, mint a két leggyakrabban előforduló mikroRNS. Még két további mikroRNS érdemel említést: a *hsa-miR-486-5p*, amely három független tanulmányban szerepel (28,8-szoros kifejeződéssel), és a *hsa-miR-923*, amely egy tanulmányban, csaknem 200-szoros kifejeződést mutatott.

A fenti mikroRNS-ek onkogén-tumor szupresszor funkcióit elemezve egy hipotézist állítottunk fel a keringő mikroRNS-ek lehetséges tumor felügyeleti hatásával kapcsolatban.

2. Táblázat. Az egészséges egyének vérmintáiban megtalálható 20 leggyakrabban előforduló mikroRNS, 5 tanulmány 61 mintája

GSE25609 (n=20)		GSE53179 (n=5)		GSE39833 (n=10)		GSE41922 (n=22)		GSE50867 (n=4)	
mikroRNS	-szeres*	mikroRNS	-szeres*	mikroRNS	-szeres*	mikroRNS	-szeres*	mikroRNS	-szeres*
hsa-miR-544	5,20	hsa-miR-451	59,10	hsa-miR-923	199,43	hsa-miR-302a	2,56	hsa-miR-451	1,47
hsa-miR-451	2,24	hsa-miR-486-5p	28,80	hsa-miR-451	36,33	hsa-miR-145	2,31	hsa-miR-16	1,28
hsa-miR-302d	2,14	hsa-miR-223-3p	11,12	hsa-miR-1202	12,52	hsa-miR-551a	1,56	hsa-miR-486-5p	1,23
hsa-miR-504	2,06	hsa-miR-15b-5p	8,88	hsa-miR-1225-5p	5,15	hsa-miR-582-5p	1,50	hsa-miR-19b	1,18
hsa-miR-486-5p	2,02	hsa-miR-92a-3p	8,40	hsa-miR-671-5p	4,0	hsa-miR-181c	1,39	hsa-miR-92a	1,14
hsa-miR-550	1,93	hsa-miR-25-3p	5,77	hsa-miR-652	1,78	hsa-miR-338-3p	1,23	hsa-miR-638	1,12
hsa-let-7a	1,65	hsa-let-7a-5p	3,11	hsa-miR-324-3p	1,68	hsa-miR-142-5p	1,23	hsa-miR-22	1,11
hsa-miR-221	1,65	hsa-miR-140-3p	2,38	hsa-miR-144	1,62	hsa-miR-122	1,18	hsa-miR-1225-5p	1,11
hsa-miR-622	1,45	hsa-miR-107	2,03	hsa-miR-1268	1,42	hsa-miR-26b	1,17	hsa-miR-720	1,09
hsa-miR-223	1,45	hsa-miR-185-5p	2,01	hsa-miR-320d	1,25	hsa-miR-29a	1,16	hsa-miR-21	1,08

hsa-miR-380	1,36	hsa-miR-30c-5p	1,90	hsa-miR-16	1,23	hsa-miR-1537	1,16	hsa-miR-1207-5p	1,06
hsa-miR-202	1,28	hsa-miR-425-5p	1,70	hsa-miR-142-3p	1,21	hsa-miR-199a-5p	1,12	hsa-miR-1915	1,05
hsa-miR-20a	1,18	hsa-miR-22-3p	1,56	hsa-miR-1287	1,21	hsa-miR-769-5p	1,11	hsa-miR-320c	1,04
hsa-miR-122	1,17	hsa-let-7f-5p	1,40	hsa-miR-1246	1,19	hsa-let-7i	1,11	hsa-miR-1202	1,04
hsa-let-7g	1,12	hsa-miR-103a-3p	1,33	hsa-miR-223	1,14	hsa-miR-223	1,11	hsa-miR-20a	1,02
hsa-miR-150	1,10	hsa-miR-19b-3p	1,30	hsa-miR-188-5p	1,14	hsa-miR-409-3p	1,10	hsa-miR-25	1,01
hsa-miR-551a	1,02	hsa-let-7b-5p	1,13	hsa-miR-513a-5p	1,12	hsa-miR-21	1,01	hsa-miR-15a	1,01
hsa-miR-25	1,00	hsa-miR-15a-5p	1,04	hsa-miR-760	1,07	hsa-miR-130b	1,00	hsa-miR-106b	1,01
hsa-miR-623	1,00	hsa-miR-320d	1,00	hsa-miR-720	1,00	hsa-miR-20a*	1,00	hsa-miR-19a	1,00

Az expressziós eredmények a Gene Expression Omnibus adatbázisból kerültek letöltésre (GSE25609, GSE53179, GSE39833, GSE41922, GSE50867). A mikroRNS-ek a kifejeződési értékeik alapján vannak rangsorolva. A táblázat az említett tanulmányok top 20 mikroRNS-ét tartalmazza.

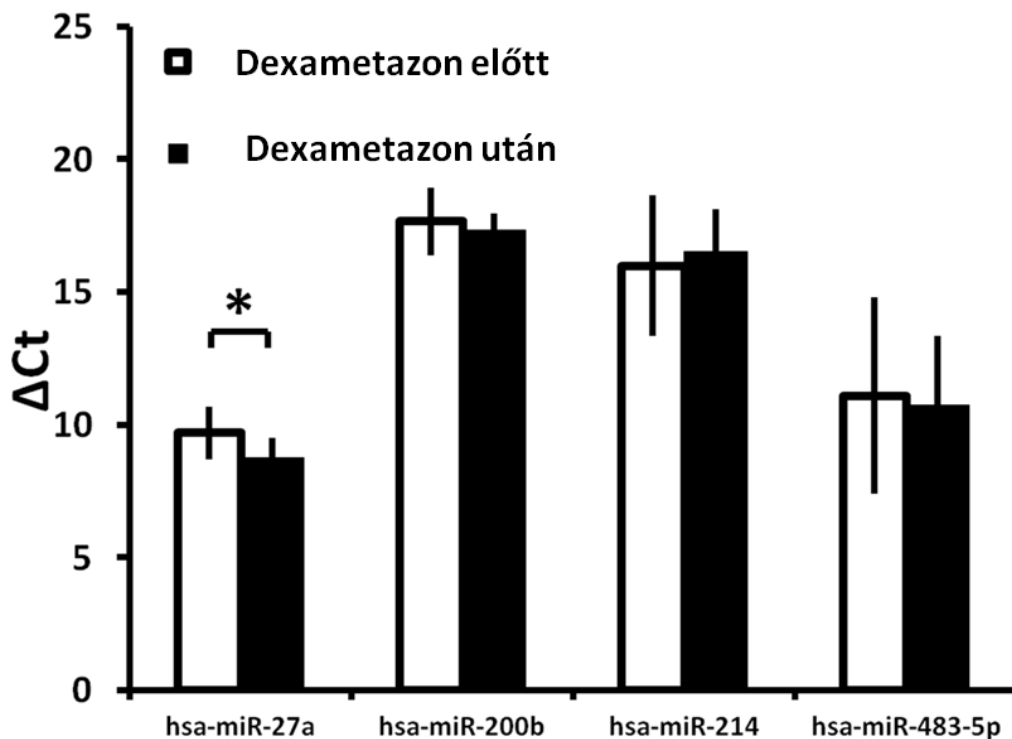
*: Az értékek a 20. legmagasabb kifejeződést mutató mikroRNS expressziós szintjéhez képest lettek számítva (-szeres). Az adatok elemzésére saját JAVA programnyelven fejlesztett programot használtunk. A vastagon szedett mikroRNS-ek relatív túlsúlya figyelhető

meg három független tanulmányban. (A -3p-vel és -5p-vel jelzett mikroRNS-ek ugyanarról a mikroRNS génről átíródott prekurzor mikroRNS két karját jelzik.)

4.2 Keringő mikroRNS-ek változása a Dexametazon és ACTH-tesztek során

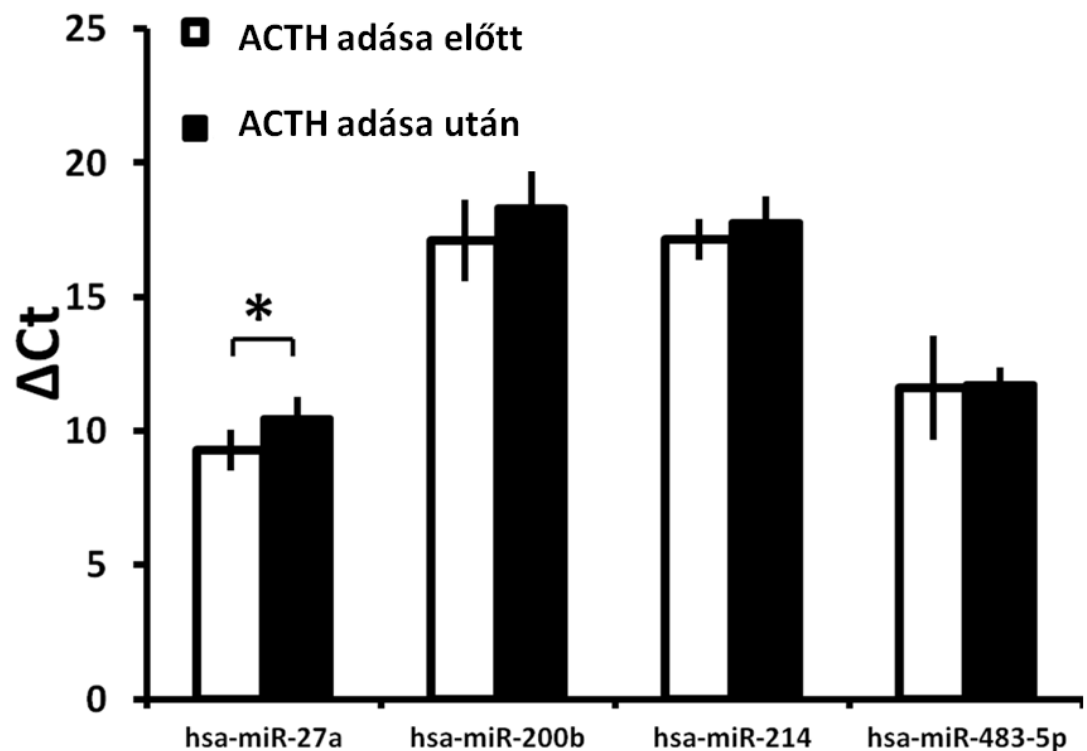
Az RNS izolálás során nyert minta vizsgálatok a mért RNS integritási szám (RNA Integrity Number = RIN) – hasonlóan a vérből történő RNS izolálásáról közölt irodalmi eredményekhez - alacsonynak bizonyult (2.0 körül) (Kim és mtsai 2014).

Kutatásunk során a kiválasztott öt mikroRNS közül mindössze egy esetében (*hsa-miR-27a*) tapasztaltuk azt, hogy kifejeződése Dexametazon, illetve Tetracosactide hatására szignifikánsan változik. A Dexametazon és a Tetracosactide kezelések hatására a *hsa-miR-27a* kifejeződésében ugyanakkor ellentétes változást tapasztaltunk: amíg a Dexametazon hatására annak plazmaszintje nőtt (1,38-szorosra), Tetracosactide hatására csökkent kifejeződést tapasztaltunk (0,26-szorosra) (4-5. ábra). A *hsa-miR-503* kifejeződése a plazmában a méréshatárnál alacsonyabbnak bizonyult, így a további analizisétől eltekintettünk.



4. ábra: A vizsgált mikroRNS-ek kifejeződésének változásai Dexametazon hatására. A Dexametazon növeli a hsa-miR-27a kifejeződését. A ΔCt ábrázolása miatt a csökkenés növekedést jelent, és fordítva.

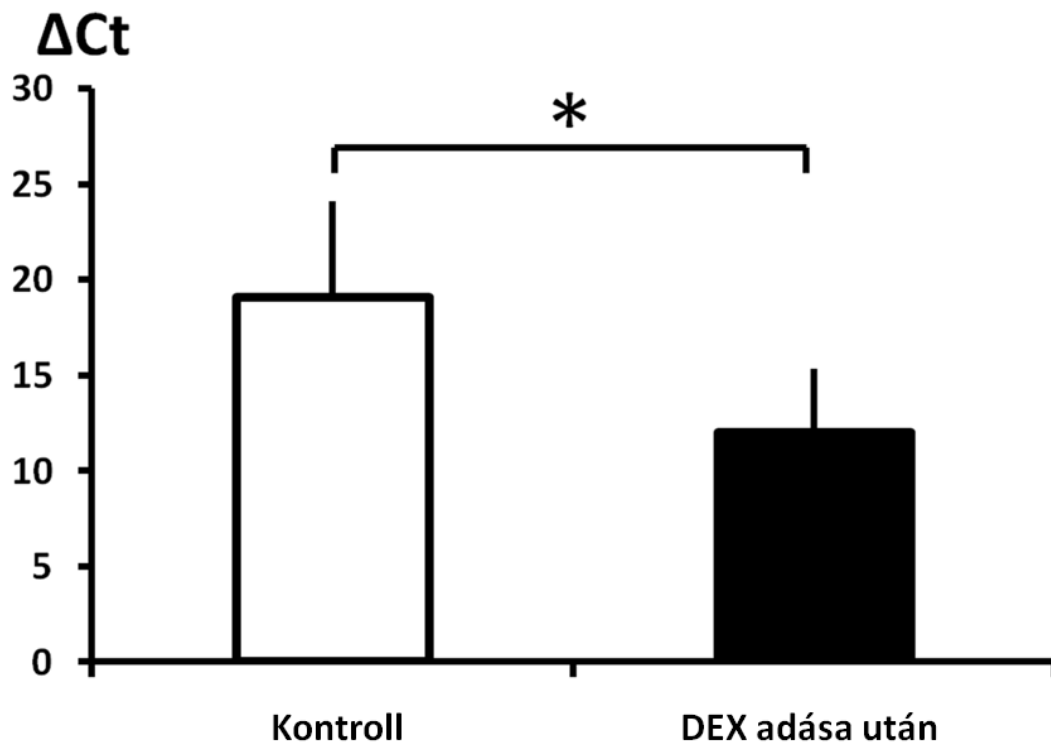
Nem találtunk összefüggést a keringő mikroRNS-ek szintje és a kortizolszintek között sem a Dexametazonnal, sem a Tetracosactide-dal kezelt csoportban.



5. ábra: A vizsgált mikroRNS-ek kifejeződésének változásai ACTH hatására. Az ACTH csökkenti a hsa-miR-27a kifejeződését. A ΔCt ábrázolása miatt a csökkenés növekedést jelent, és fordítva.

Annak megerősítésére, hogy a hsa-miR-27a keringésben igazolt változása esetlegesen mellékvesekéreg eredetű, *in vitro* kísérleteket végeztünk humán mellékvesekéreg NCI-H295R sejtvonalon. A RIN számok ebben az esetben 9.0 és 10.0

között mozogtak. Dexametazon kezelést követően szignifikánsan nőtt a szekretált *hsa-miR-27a* kifejeződése a *NCI-H295R* sejtek tenyésztőfolyadékában. A Dexametazon hatására az *NCI-H295R* sejtekben az intracelluláris *hsa-miR-27a* kifejeződése is nőtt, ugyanakkor ennek mértéke statisztikailag nem volt szignifikáns. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *NCI-H295R* sejtek kiválasztják a *hsa-miR-27a*-t és a kiválasztott *hsa-miR-27a* kifejeződése Dexametazon hatására nő (**6. ábra**).



6. ábra: A szekretált *hsa-miR-27a* kifejeződése nő Dexametazon hatására *in vitro* az *NCI-H295R* sejtvonalon.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 Az egészséges egyénekből kimutatható keringő mikroRNS-ek lehetséges szerepe. A tumor szupresszor mikroRNS-ek relatív túlsúlya a keringő mikroRNS-ek között és egy új hipotézis – keringő mikroRNS-ek, mint a tumorképződés gátlói? (tumor surveillance?)

Munkám során elemeztem a keringésben jelenlevő mikroRNS-eket saját *in silico* vizsgálatok és a szakirodalmi adatok tanulmányozása révén. Elemzéseink szerint a legmagasabb expressziót mutató mikroRNS-ek közül számos elsősorban tumor szupresszorként funkcionál. Az egyik legismertebb tumor szupresszor mikroRNS-t, a *hsa-miR-16-t* eredetileg krónikus limfoid leukémiában írták le (Aqeilan és mtsai 2010). A *hsa-miR-16* egyike a leggyakrabban használt referencia mikroRNS-eknek a keringő mikroRNS kutatások során (Szabó és mtsai 2014), mivel viszonylag magas és stabil kifejeződést mutat a vérben. A mikroRNS-ek *hsa-let-7* családját elsősorban tumor szupresszor aktivitással rendelkező mikroRNS-eknek tartják számon; például tüdőrákban is ez az egyik legrelevánsabb mikroRNS család (Boyerinas és mtsai 2010).

A *hsa-let-7f* mellett – amelyről kimutatták, hogy a többi mikroRNS-hez képest felülreprezentált a plazmában (Mitchell és mtsai 2008) – a *hsa-let-7* család más tagjairól mint a *hsa-let-7a-ról*, illetve a *hsa-let-7g-ről* szintén kimutatták, hogy magasabb koncentrációban vannak jelen a keringésben (Chen és mtsai 2008).

Saját *in silico* vizsgálataink (2. táblázat) is megerősítették azt, hogy a *let-7* családhoz tartozó mikroRNS-ek a 20 leggyakrabban előforduló mikroRNS között (*hsa-let-7a*, *hsa-let-7b*, *hsa-let-7f*, *hsa-let-7g*, *hsa-let7i*) fordulnak elő egészséges egyének plazmájában.

A további mikroRNS-ek közül a *hsa-miR-451*-ről leírták, hogy kínai egyének vérében magasabb koncentrációban van jelen (Chen és mtsai 2008), illetve az *in silico* vizsgálatot közlő öt tanulmány közül négyben azt tapasztalták, hogy különböző tumorszövetekben (glioma, kolorektális rák, liposzarkóma, oszteoszarkóma)

alacsonyabb koncentrációban van jelen, amely tumor szupresszor aktivitásra utal (Liu és mtsai 2014, Godlewski és mtsai 2010, Bitarte és mtsai 2011, Namlos és mtsai 2012, Gits és mtsai 2014, Xu és mtsai 2013)

A másik olyan keringő mikroRNS, amely a többihez képest felülreprezentált volt a *hsa-miR-223*, amely hematológiai és szolid tumorok esetében is szerepet játszhat a karcinogenezisben és a tumorfajtától függően, mind onkogén, mind tumor szupresszor aktivitással rendelkezik (Haneklaus és mtsai 2013). Tüdőrák sejtvonal vizsgálata során a *hsa-miR-223* erőteljes tumor szupresszor aktivitásáról számoltak be (Nian és mtsai 2013, Glasgow és mtsai 2013).

A Tanaka és mtsai által legelsőnek/legmagasabb kifejeződésűnek rangsorolt *hsa-miR-638* (Tanaka és mtsai 2009) gyomorrákban mutat tumor szupresszor aktivitást (Zhao és mtsai 2014).

A Weber és mtsai által közölt tanulmányban a legmagasabb koncentrációjú *hsa-miR-335* antitumorális aktivitását számos tumorfajtában kifejti, többek között a kolorektális rák (Sun és mtsai 2014), a gyomorrák (Li és mtsai 2014), petefészekrák (Cao és mtsai 2013) és oszteoszarkóma esetében (Wang és mtsai 2013). A Weber és mtsai által közölt harmadik leggyakoribb *hsa-miR-377* metasztatizáló prosztatatarákban tumor szupresszor aktivitással rendelkezik (Formosa és mtsai 2013). Az ugyanezen munkacsoport által második leggyakrabban előfordulónak minősített *hsa-miR-325*-ről onkogenitás szempontjából releváns adatok nem állnak rendelkezésre.

A saját *in silico* vizsgálatunk során talált további két mikroRNS szintén tumor szupresszor aktivitással bír: a *hsa-miR-486-5p* emlőrákban (Tahiri és mtsai 2014) és tüdőrákban (Wang és mtsai 2014); a *hsa-miR-923* pedig krónikus limfoid leukémiában (Zhu és mtsai 2012).

Megjegyezzük ugyanakkor azt is, hogy a leggyakrabban előforduló mikroRNS-ek között onkogén tulajdonsággal rendelkező mikroRNS-ek is megtalálhatók, például a *hsa-miR-21* (Hong és mtsai 2013), amelynek 9-szer magasabb a kifejeződése, mint a 20. leggyakoribb mikroRNS-nek Mitchell és mtsai tanulmányában (Mitchell és mtsai 2008), és a vizsgálatba bevont öt tanulmányból három esetben a 20 leggyakrabban előforduló mikroRNS közé tartozik a saját *in silico* vizsgálatunkban.

Fontos még megjegyezni, hogy a mikroRNS-ek többségéhez hasonlóan, a viszonylag gyakrabban előforduló mikroRNS-ekre számos esetben Janus arcú működés

jellemző: az adott szöveti kontextustól függően akár tumor szupresszor, akár onkogén potenciállal rendelkezhetnek.

Mindazonáltal a leggyakrabban kifejeződő keringő mikroRNS-ek predomináns tumor szupresszor aktivitása érdekes kérdéseket vet fel. Lehetséges, hogy ezek a mikroRNS-ek a sejtek malignus átalakulását gátolják? A tumor szupresszor mikroRNS-eket tartalmazó membránvezikulák (exoszómák, mikrovezikulák) a malignusan transzformálódó sejtek membránján átlépve, az adott sejtek olyan génjeit veszik célba, amelyek a sejtciklus szabályozásáért, a sejtek proliferációjáért stb. felelősek, ami végül is csökkent proliferációhoz, a sejtciklus leállításához, illetve az apoptózis beindulásához vezethet.

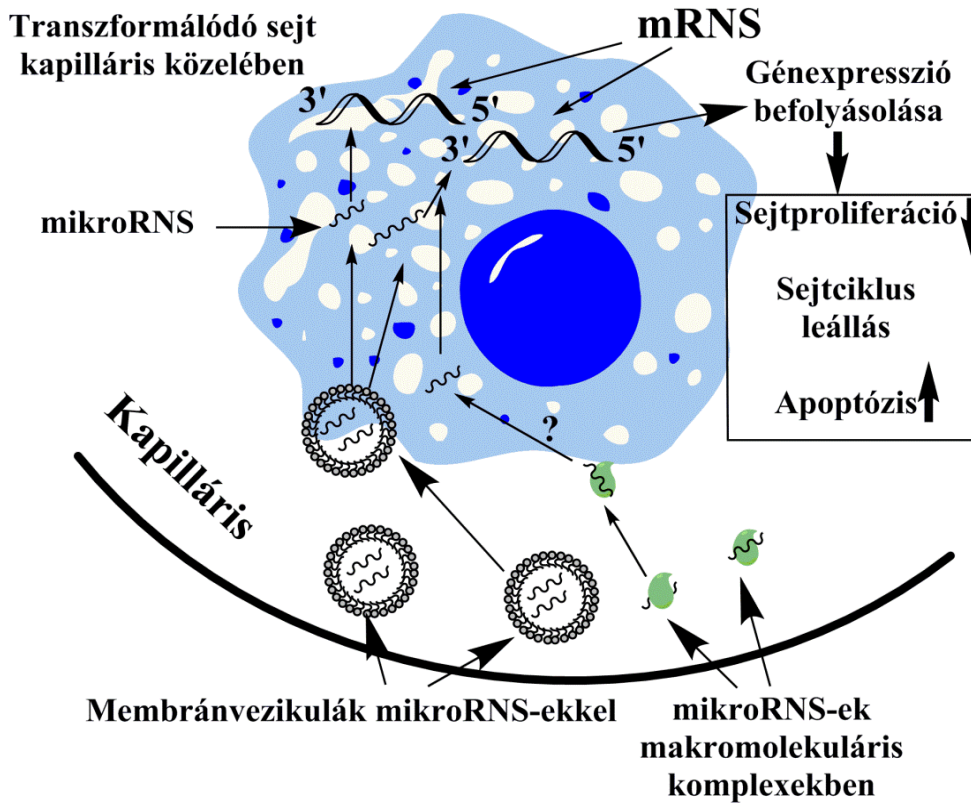
Egészséges szervezetben is gyakran keletkeznek malignus sejtek, és ezeket a sejteket a szervezet immunrendszere elpusztítja (tumor surveillance, illetve újabb angol szakkifejezéssel élve cancer immune surveillance, illetve cancer immunoediting) (Dunn és mtsai 2002). Az immunrendszer tumorelleses aktivitása meglehetősen flexibilis és gyors válaszkészséggel rendelkezik ahhoz, hogy a szervezetre potenciálisan káros sejteket el tudja távolítani (Hamai és mtsai 2010).

Lehetséges, hogy a keringő mikroRNS-ek az epigenetikai információ közvetítésével a sejtek malignus transzformációját gátolják? Ha igen, akkor a keringő mikroRNS-ek állandó védelmet jelenthetnek a sejtek malignus átalakulásával szemben **(7. ábra)**.

A szöveti mikroRNS-ek diszregulációja a tumorképződés korai lépésének számít (Cortez és mtsai 2011), és a mikroRNS-ek koncentrációjának megváltozása (elsősorban a tumor szupresszor aktivitással bíró mikroRNS-ek szintjének szignifikáns csökkenése útján) szintén szerepet játszhat a tumorképződésben. A keringő mikroRNS-ek által közvetített tumor szupresszor epigenetikai információ újraprogramozhatja a születőben lévő tumorsejteket, még a malignus transzformáció kezdeti szakaszában azok proliferációjának gátlása, illetve apoptózisának indukciója útján, pedig meggátolhatja a tumorképződést.

A tumorképződés mikroRNS-ek útján történő folyamatos gátlása az immunválasszal párhuzamosan történhet. Tekintettel arra, hogy a genetikai változások a fehérje expressziótól függő immunválasznál jóval korábban bekövetkeznek, a tumorképződés gátlásának mikroRNS-ek útján bekövetkező epigenetikai útja

megelőzheti, és egyben támogatja is az immunrendszer tumor felügyeletét (cancer surveillance).



7. ábra: Hipotézisünk alapján a mikroRNS-ek által közvetített „tumor surveillance” sematikus bemutatása

Mindenesetre a rákos betegekből és egészséges egyénekből származó mikroRNS-ek célpontjainak azonosítása és kutatása hozzájárulhat a mikroRNS-ek tumor szupresszor - onkogén mechanizmusának jobb megértéséhez.

A tumorképződés kezdeti szakaszában történő, a születő tumorsejteket érintő újraprogramozáson túl a keringő mikroRNS-ek a tumorképződés egyéb jóval előrehaladottabb fázisait is befolyásolhatják (angiogenezis, invázió stb.) (Hanahan és mtsai 2011). A keringő mikroRNS-ek angiogenezisben betöltött szerepe ismert az irodalomban (Finn, Searles 2012). Az endothelium sejtjei a keringő mikroRNS-ek számára a leginkább hozzáférhető célpontok lehetnek. Elképzelhető, hogy a keringő mikroRNS-ek közvetlenül befolyásolják a szervezet antitumor immunitását és az is,

hogy a keringő mikroRNS-ek nem pusztán kiegészítik, hanem együttműködnek a daganatok immunrendszer általi felügyeletében.

A keringő mikroRNS-ek tumorképződésben betöltött szerepéről hasonló érdekes hipotézist publikáltak *Chen és mtsai* (Chen és mtsai 2013), akik megfigyelték, hogy a tumoros betegek vérében a keringő mikroRNS-ek közül az elsősorban tumor szupresszor aktivitással rendelkezők vannak többségben az onkogén mikroRNS-ekhez képest. A tumor szupresszor mikroRNS-ek relatív túlsúlya a szervezet tumorellenes védelmi mechanizmusa egy formájának tekinthető a szerzők szerint (Chen és mtsai 2013). Ugyanez a munkacsoport felvetette, hogy ezen mikroRNS-ek tumorellenes hatása elsősorban a tumorellenes immunválasz serkentésén keresztül valósulhat meg. A mi hipotézisünk ugyanakkor az, hogy az egészséges egyének vérében keringő tumor szupresszor mikroRNS-ek egyfajta antitumor felügyeleti rendszert látnak el a tumorképződés legkorábbi fázisában a születő tumorsejtek újraprogramozása által.

Az általunk felállított hipotézis gyenge oldalát leginkább az képezheti, hogy a mikroRNS-ek celluláris kontextustól függően lehetnek onkogén, illetve tumor szupresszor hatásúak. Még az elsősorban tumor szupresszor aktivitással rendelkező mikroRNS-eknek is lehet onkogén hatásuk bizonyos meghatározott szövetekben. Az általunk a leggyakoribbnak talált keringő mikroRNS-ek vizsgálatához felállított 10-szeres határ (a rangsorban 20. mikroRNS-hez képest 10-szeresen kifejeződő) természetesen önkényes, és a fenti küszöbérték alatti kifejeződéssel bíró mikroRNS-ek között is találhatóak mind onkogén, mind szupresszor aktivitású mikroRNS-ek, mint a *hsa-miR-21*. Mindazonáltal az elsősorban tumor szupresszor hatással rendelkező mikroRNS-ek relatív túlsúlya figyelemreméltó a 10 szeres határ feletti kifejeződésű csoportban.

A hipotézissel kapcsolatos másik probléma a keringő mikroRNS-ek nagyon alacsony mennyiségével kapcsolatos. Még a legmagasabban kifejeződő mikroRNS-eknek is nagyon alacsony a koncentrációja, és azt sem tudjuk, hogy ez az alacsony koncentráció elegendő-e ahhoz, hogy, az ezen mikroRNS-eket internalizáló sejtekben szignifikáns génexpresszió változást tudjon kiváltani. A membrán vezikulumokba csomagolt, és a lipoprotein asszociált mikroRNS-ek esetében rendelkezésre állnak olyan *in vitro* adatok, amelyek azok génexpresszió szabályozó kapacitását alátámasztják (Redis és mtsai 2012, Rayner és mtsai 2013), de arra vonatkozóan nincsenek adatok,

hogy a keringő mikroRNS-ek a szövetekben valóban génexpressziós változásokat idéznek elő. Legújabb vizsgálatok szerint a mikroRNS-ek vérben mért koncentrációja 100 fmol/l nagyságrendű, ami messze alacsonyabb, mint a legalacsonyabb koncentrációjú hormonoké. Ez az alacsony koncentráció komoly kérdéseket vet fel a mikroRNS-ek biológiai jelentőségével kapcsolatban, és kérdés, hogy mekkora koncentráció szükséges ahhoz, hogy érdemi hatásuk legyen. Felvetették mikroRNS receptor lehetőségét is, de erre vonatkozó kísérletes adat még nem áll rendelkezésre (Williams és mtsai 2013).

A következő kérdés az érintett sejtpopulációkkal kapcsolatos. Az egyértelmű, hogy a keringő mikroRNS-ek közvetlen érintkezésbe kerülnek a vér és az érfal endotheliális sejteivel, de milyen egyéb sejtek érintettek még és milyen módon? A legvalószínűbb válasz erre a kérdésre, hogy a mikroRNS-ek át tudnak hatolni a kapilláris endotheliumon, amint arra utaló adatok már vannak, hogy az exogén mikroRNS-ek átjutnak az intesztinális endotheliumon és bejutnak a keringésbe (Zhang és mtsai 2012, Etheridge és mtsai 2013). A mikroRNS-ek gastrointesztinális transzferje ugyanakkor erősen vitatott, ugyanis egyes kutatási eredmények azt mutatják, hogy ez a folyamat nem hatékony (Snow és mtsai 2013).

Az exoszómákról kimutatták, hogy át tudnak hatolni a vér-agy gáton (Alvarez és mtsai 2011). Nem ismert ugyanakkor, hogy a fehérjéhez, illetve a HDL-hez kötött mikroRNS-ek is képesek-e erre, és az ezen folyamatokért felelős molekuláris mechanizmusok egyelőre még nem ismertek. Az a tény azonban tudott, hogy a mikroRNS-ek különböző raktározási formái (nem kötött, extracelluláris vezikulum, fehérjéhez kötődő) különböző féléletidővel járhatnak együtt. Sőt, a különböző mikroRNS-ek raktározási formájának szelektivitását sem zárhatjuk ki.

Az egészséges egyének mikroRNS profiljának természetesen vannak interindividuális és etnikai variációi, amint a különböző kutatócsoportok eredményein láthatjuk. Bizonyos szokások is (például a dohányzás) szignifikánsan befolyásolhatják a mikroRNS profilt (Takahashi és mtsai 2013). Egy általános, "normális" mikroRNS profilt ezért nagyon nehéz felállítani. Módszertani problémák szintén felelőssé tehetők a variációkért, hiszen a standardizált mikroRNS kivonás nehézségei, platform különbségek (microarray, valós idejű PCR-alapú technikák, újgenerációs szekvenálás) szintén befolyásolhatják az eredményeket.

Az általunk felállított hipotézist kísérletes úton alátámasztani meglehetősen nehéz. *In vitro* kísérletek szóba jöhetnek annak igazolására, hogy a mikroRNS-ek a sejtkultúrákból származó vírus, illetve kémiai indukció által transzformált születőben lévő tumorsejtekben megállítják a tumorképződést, vagy proapoptotikus hatással bírnak. Tekintettel arra, hogy a hipotézisünk a korai tumorképződést *in vivo* tárgyalja, állatkísérletes modellek jöhetnek szóba. Az elsősorban tumor szupresszor hatású mikroRNS-eket lehetne beadni tumoros egér modellekbe (spontán vagy kémiai úton indukált tumorokban, immunszupprimált egerekben) és a tumorképződés gyakoriságát lehetne vizsgálni.

Számos probléma merülhet fel azonban az ilyen jellegű vizsgálatok esetében így például a mikroRNS koncentrációjával, annak bejuttatásának módjával kapcsolatban stb. Ennek alternatívájaként meghatározott, és a keringésben túlsúlyban lévő mikroRNS-ekre transzgenikus, illetve knockout egér modelleket lehetne vizsgálni spontán vagy indukált tumor frekvencia szempontjából. Az elérhető a *miR-223* és a *miR-451* mikroRNS-ekre knockout egérmodellek esetében ugyanakkor spontán tumorgyakoriság tekintetében növekedést nem tudtak kimutatni (Johnnidis és mtsai 2008, Patrick és mtsai 2010). Ezekben a vizsgálatokban hosszabb tumor indukció és megfigyelési idő lehet szükséges. A mikroRNS-ek által biztosított tumor felügyelet ugyanakkor nem egyetlen mikroRNS bevonásával valósulhat meg, hanem inkább számos mikroRNS együtműködése által, ezért különböző tumor szupresszor aktivitású mikroRNS-ek kombinációját kellene vizsgálni.

5.2 Néhány további hipotézisünk a keringő, testfolyadékokban kimutatható mikroRNS-ek biológiai jelentőségével kapcsolatban.

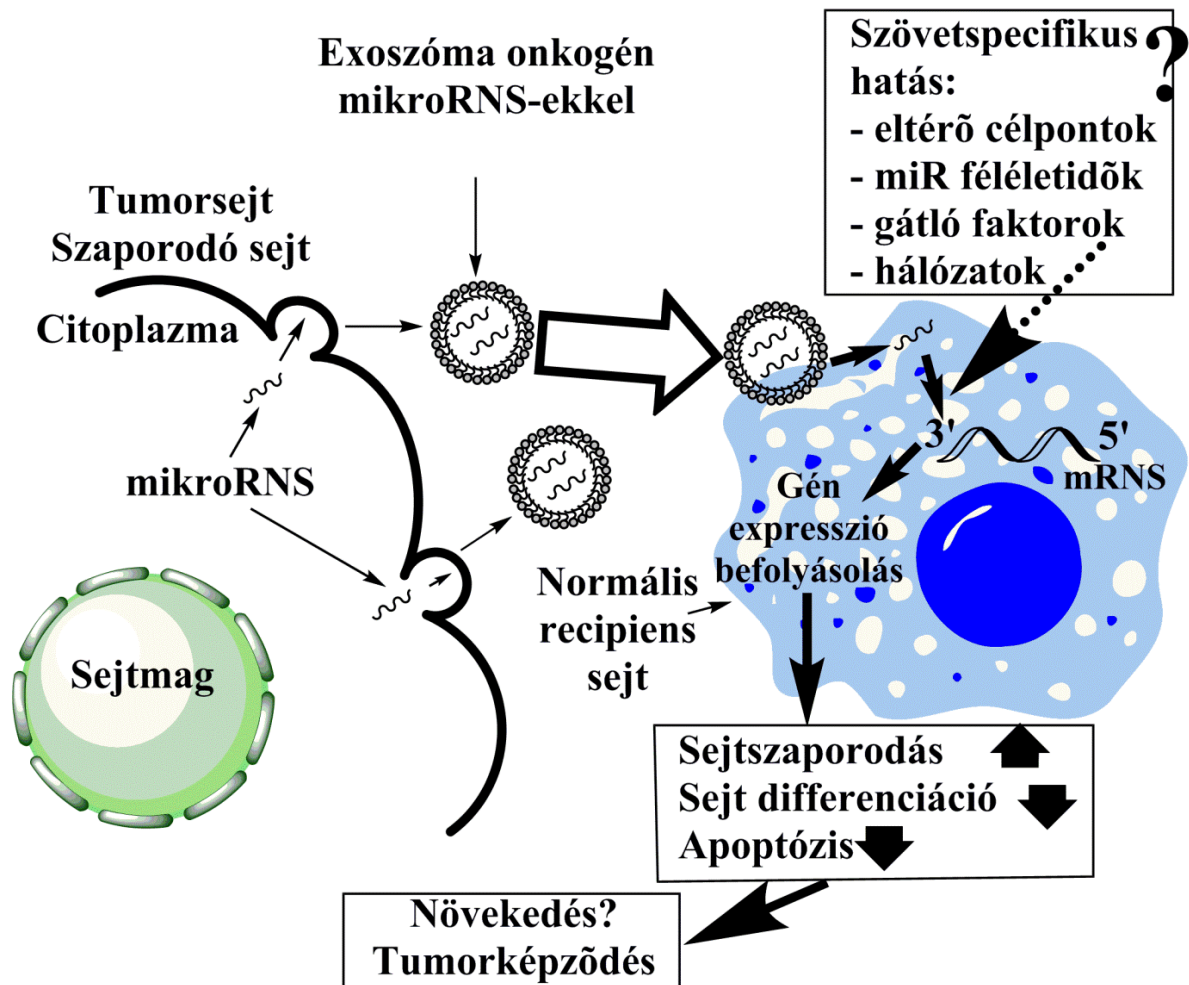
A mikroRNS-ek szövetspecifikus hatása egy daganatképződést gátló védelmi mechanizmusnak is része lehetne?

A korábbiakban már említésre került, hogy a mikroRNS-ek kifejeződése és hatása is szövetspecifikus, azaz ugyanaz a mikroRNS különböző szövetekben eltérő mRNS-eket szabályoz. Ugyanaz a mikroRNS egyik szövetben onkogén, másokban tumor szupresszor is lehet. A mikroRNS-ek szövetspecifikus hatásának molekuláris mechanizmusa nem ismert, de ebben szerepet játszhat esetlegesen eltérő féléletidejük, esetleges mikroRNS inhibitorok jelenléte, illetve a mikroRNS-ek, transzkripciós faktorok és gének alkotta hálózatok szabályozási eltérései is.

Ismert ugyankor az is, hogy mind az ép sejtek, mind a kóros, különösen a daganatsejtek mikroRNS-eket választanak el, amelyek közül a membránvezikulákba zárt mikroRNS-eknek lehet leginkább biológiai jelentőségük. A daganatsejtek által elválasztott mikroRNS-ek elősegíthetik a daganatok növekedését, a stromára, endothelsejtekre, immunsejtekre hatva támogathatják a daganat terjedését. Feltételezésünk szerint a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatása bizonyos mértékig gátat szabhat ennek a hatásnak, mivel a daganatok által elválasztott mikroRNS csoportok - a szövetspecifikus mikroRNS hatásnak köszönhetően- nem fejthetik ki ugyanazt a hatást különböző szöveteken. Így például az elválasztott onkogén mikroRNS-ek nem képesek minden sejt növekedését serkenteni.

Ebben a vonatkozásban nem egyes mikroRNS-eknek, hanem mikroRNS csoportoknak lehet elsősorban szerepe, amelyek számos mRNS befolyásolásán keresztül fejthetnék ki hatásaikat. Igen valószínűtlen, hogy a szövetspecifitás nyomán több mikroRNS eltérő mRNS célpontjai ugyanazt vinnék véghez a célsejtben, mint a mikroRNS-eket elválasztó sejtben. Elképzelhető, hogy ez nemcsak a daganatsejtek, hanem a gyorsan szaporodó őssejtek által elválasztott mikroRNS-ekkel szemben is érvényesülhet, azonban ezek mennyisége messze kevesebb lehet, mint a daganat által termelt mikroRNS-eké.

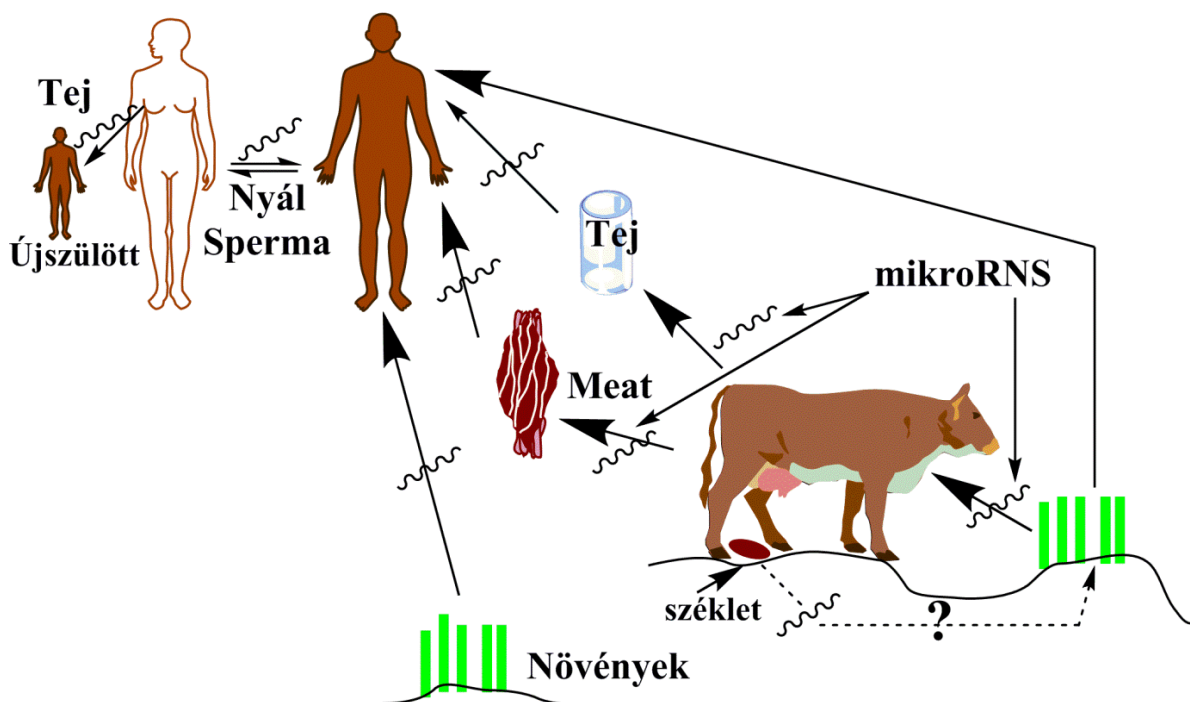
Ennek a mechanizmusnak a daganatok és növekedési zavarok kialakulásának gátlásában lehet esetleg szerepe (8. ábra).



8. ábra: A daganatsejt által elválasztott, exozómában lévő onkogén mikroRNS-ek más sejteken jelentkező sejtnövekedést, daganatot elősegítő hatását a mikroRNS-ek szövet-specifikus hatása gátolhatja, aminek révén az eredeti szövetben onkogén mikroRNS csoportok más szövetben nem fejtik ki ugyanazt a hatást. A mikroRNS-ek szövet-specifikus hatása így a daganatképződés és növekedési zavarok gátja lehet.

5.3 A testfolyadékba jutó mikroRNS-ek lehetséges szerepe az egyének és fajok közötti kommunikációban

Míg a vérben keringő mikroRNS-ek normálisan nemigen jutnak más egyénnel kapcsolatba, az anyatejben, nyálban és az ondóban található mikroRNS-ek közvetlen kapcsolatba kerülhetnek más személyekkel (újszülöttek, szexuális partnerek), és ebben az esetben az epigenetikai információ interindividuális átadása valósulhat meg (9. ábra). Az anyatej mikroRNS-ei az újszülött epigenetikai befolyásolásában is szerepet játszhatnak, és léteznek hipotézisek arra vonatkozóan, hogy az anyatej mikroRNS-ei betegségekben, így a diabetes mellitus és atopia kialakulásában is szerepet játszhatnak (Melnik és mtsai 2014, Melnik 2015).



9. ábra: MikroRNS-ek, az egyének és a fajok között vándorló hírvivők?

Forradalmi volt az a nemrégiben közölt megfigyelés, hogy kínai egyének vérében a rizs egyik mikroRNS-e (*miR-168a*) kimutatható (Zhang és mtsai 2012). Sőt, a

rizs *miR-168a* egy humán mRNS (LDLRAP1) expresszióját befolyásolni látszott, ami a koleszterin metabolizmusában játszik szerepet. Egy növényi mikroRNS emberi hatása a mikroRNS-ek fajok közötti hatását jelezheti, ami új távlatokat nyithatna a mikroRNS-ek globális jelentőségéről. Ezt a megfigyelést azóta számos független tanulmány vitatja, így nem általánosan elfogadott (Witwer és Hirschi, 2014). Míg a növényi mikroRNS-eket eltérő kémiai szerkezetük nyomán viszonylag könnyű elkülöníteni, az állati eredetűek elkülönítése sokkal nehezebb. Mindazonáltal valószínű, hogy az elfogyasztott állati termékek mikroRNS-ei is bejuthatnak az emberi keringésbe. Tehéntej mikroRNS-ek bejutásáról is vannak adatok, de ezt is vitatják (Baier és mtsai 2014).

Bár ezek kevés meggyőző kísérleti eredménnyel és számos kétellyel társult feltételezések, igen érdekes további hipotézisekhez vezethetnek. Ezek közé tartozhat az, hogy az egyoldalú táplálkozás a mikroRNS-ek egyoldalúan túlzott bevitele, vagy akár hiánya nyomán betegségekhez vezethet, de erre sincsenek egyelőre kísérletes adatok.

A fajok között epigenetikai információt közvetítő mikroRNS-ekre vonatkozóan felvetettük annak a lehetőségét, hogy a genom jelentős részét kitevő nem kódoló rész - amit korábban a genom sötét anyagának tekintettek - egyik funkciója a jelentős részben ebben található mikroRNS gének révén az egyének és fajok közötti epigenetikai kommunikáció közvetítése lenne, de természetesen ennek alátámasztására egyelőre semmiféle kísérletes adat nem áll rendelkezésre.

Munkám második részében a keringésben jelen levő és korábban a mellékvesekéreg carcinoma esetében potenciális biomarker mikroRNS-ekre fókuszáltam. Mivel ezekben a betegekben rutinszerűen alkalmaznak hormonstimulációs tesztek, felvetődött, hogy a diagnosztikus mikroRNS-ek vérben mérhető koncentrációját esetleg befolyásolhatják az alkalmazott hormonok. Szintén ismeretesek voltak hormon érzékeny mikroRNS-ek, ezek vizsgálata is munkám részét képezte.

5.4 A mikroRNS-ek változásai Dexametazon és ACTH kezelésre, összevetésük irodalmi adatokkal, illetve a *miR-27a* változásának esetleges jelentősége

Öt keringő mikroRNS-t (*hsa-miR-27a*, *hsa-miR-200b*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-483-5p*, *hsa-miR-503*) választottunk ki irodalmi adatok alapján annak tanulmányozására, hogy kifejeződésük hogyan változik *in vivo*, Dexametazon és ACTH adására. A fenti mikroRNS-ek közül a *hsa-miR-214*, a *hsa-miR-503* és a *hsa-miR-483-5p* mellékvesekéreg carcinoma-ban a daganatok rosszindulatúságát jelző, megváltozott kifejeződésű szöveti mikroRNS biomarkerként jönnek szóba (Tömböl és mtsai 2009, Patterson és mtsai 2011, Soon és mtsai 2009). A *hsa-miR-483-5p* szintjét mellékvesekéreg carcinoma-ban szenvedő betegek vérében is magasabbnak találták (Szabó és mtsai 2014, Charbre és mtsai 2013, Patel és mtsai 2013). A *miR-214* és a *miR-503* szöveti kifejeződésének csökkenését mutatták ki ACTH hatására patkány modellben (Hu és mtsai 2013).

Irodalmi adatok alapján két további mikroRNS (a *hsa-miR-27a* és a *hsa-miR-200b*) - melyről igazolódott, hogy kifejeződésük hormonkezelések hatására változik patkánymodellben - kifejeződése csökkent Dexametazon hatására. A *hsa-miR-27a* szintje patkány mellékvesekéregben csökkent ACTH hatására (Hu és mtsai 2013). Kutatási eredményeink a keringő *hsa-miR-27a* kifejeződésének megváltozását igazolták hormonkezelések hatására *in vivo* emberben, kifejeződése Dexametazon hatására nő, ACTH hatására pedig csökken. Ehhez hasonlóan, *in vitro* kísérletünkben Dexametazon hatására a szekretált *hsa-miR-27a* kifejeződés növekedését tapasztaltuk.

A mellékvesekéreg rosszindulatú daganatában jelenleg legígéretesebb keringő mikroRNS marker a *hsa-miR-483-5p* szintjét a fenti (diagnosztikai célból széles körben alkalmazott) hormonkezelések nem befolyásolták, ami alátámasztja a fenti mikroRNS potenciális biomarkerként történő használhatóságát.

A keringő mikroRNS-ek többek között a malignus daganatok diagnosztikája szempontjából ígéretes biomarkereknek számítanak. Kifejeződésüknek hormonális változásokra történő megváltozását néhány kutatás alátámasztja, például policisztás ovárium szindrómában szenvedő betegek szérumában négy mikroRNS koncentrációja a szérum szabad tesztoszteron szintjének változásával részleges korrelációt mutatott (Murri és mtsai 2013).

Tudomásunk szerint a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelyt érintő hormonális változások és a keringő mikroRNS-ek közötti összefüggést emberben, *in vivo* munkánkat megelőzően még nem vizsgálták. Néhány mikroRNS a mellékvesekéreg tumorainak kivizsgálásában hasznos biomarker lehet, így elsősorban a *miR-483-5p*, a *miR-195* és a *miR-34a* (Chabre és mtsai 2013, Szabó és mtsai 2014, Patel és mtsai 2013). Tekintettel arra, hogy a mellékvesekéreg daganat gyakran jár együtt mellékvesekéreghormon túltermeléssel (Fassnacht és mtsai 2013, Terzolo és mtsai 2013), a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely és a keringő mikroRNS-ek közötti összefüggés szintén érdekes lehet. A keringő mikroRNS-ek szintjének az ACTH és Dexametazon tesztek hatására bekövetkező változásáról eddig nem álltak rendelkezésre adatok.

In vitro a szekretált *hsa-miR-27a* szintje szignifikánsan nőtt Dexametazon kezelés hatására NCI-H295R mellékvesekéreg sejtvonalon. A tenyésztőfolyadékban talált magasabb mikroRNS koncentráció igazolja azt, hogy a Dexametazon serkenti a *hsa-miR-27a* kiválasztását a mellékvesekéreg sejtekben. A *hsa-miR-27a* szekréciónak molekuláris mechanizmusa a NCI-H295R sejtekben és annak Dexametazon-nal való összefüggése a jövőben további kutatások tárgyát képezheti.

Patkány modellben ACTH-kezelés csökkentette a szöveti *miR-27a* kifejeződését, a Dexametazon szintén ugyanilyen hatással volt annak kifejeződésére. A fenti a diszkrepanciát faji különbségekkel lehet magyarázni, ráadásul a szöveti és a keringő mikroRNS-ek kifejeződésében is lehetnek különbségek (Patel és mtsai 2013).

Emberben, a Dexametazon *in vitro* és *in vivo* hatása a *hsa-miR-27a* kifejeződésére hasonló, mivel a Dexametazon kezelés növeli a *hsa-miR-27a* kifejeződését mind NCI-H295R mellékvesekéreg sejtvonalon *in vitro* (szekretált és intracelluláris), mind a keringő *hsa-miR-27a* expresszióját *in vivo*. A keringő mikroRNS-ek celluláris eredete egyelőre még nem tisztázott, de a kifejeződés párhuzamos változásai azok részben mellékvesekéreg eredetét támasztják alá.

A *hsa-miR-27a* izmokban, angiogenezisben, adipogenezisben, elhízásban, gyulladásban, immunválaszban, lipid metabolizmusban, atherosclerosisban és metabolikus szindrómában betöltött szerepéről számos eredmény áll rendelkezésre (Chen és mtsai 2012). A keringő *hsa-miR-27a* hipertrófiás kardiomiopátiában (Roncarati és mtsai 2014) és akut miokardiális infarktust követően a bal kamrai

kontraktilitás potenciális biomarkereként is felmerült (Devaux és mtsai 2013). Kifejeződését kissejtes tüdőrák esetén is alacsonynak találták (Heegaard és mtsai 2012).

A glükokortikoidok hatásukat ezekben a szövetekben glükokortikoid receptoron keresztül fejtik ki. Dexametazon kezelés hatására az *NCI-H295R* mellékvesekéreg sejtvonalon a *hsa-miR-27a* kifejeződése megváltozott, ezért feltételezhető, hogy a fenti mikroRNS szabályozása is a glükokortikoid receptoron keresztül történik. Mivel a *hsa-miR-27a* transzkripciója az RNS polimeráz II segítségével megy végbe (Lee és mtsai 2004) érdekes lenne annak vizsgálata, hogy egy funkcionális glükokortikoid válasz elem jelen van-e a *hsa-miR-27a* promóterében (*in silico* predikciónk szerint a glükokortikoid válaszra specifikus DNS szakasz a *hsa-miR-27a* promóterében megtalálható).

A *hsa-miR-27a*-ról kimutatták, hogy az izmok kifejlődésében és sorvadásában jelentős szerepet játszó myostatin expresszióját csökkenti. A myostatin fokozott expresszióját az izomtömeg csökkenésével hozták összefüggésbe (McFarlane és mtsai 2014). Úgy tűnik, hogy a *miR-27a* és a myostatin egy önszabályozó körben vesznek részt, ugyanis egér modellen a myostatin növeli a *miR-27a* kifejeződését a *SMAD3*-on keresztül, és válaszul a *miR-27a* gátolja a myostatin kifejeződését (McFarlane és mtsai 2014). Tekintettel arra, hogy a glükokortikoidok gátolják a *SMAD3* transzkripciós aktiválását (Song és mtsai 1999), a beadott Dexametazon a myostatin-*SMAD3-miR-27a* szabályozó körbe több ponton is bekapcsolódhat.

A keringő *hsa-miR-27a* ACTH által indukált csökkenése szerepet játszhat az ACTH-függő Cushing-szindrómában. A *miR-27a* myostatinra gyakorolt hatása a fenti mechanizmuson keresztül a hiperkortizolizmusra jellemző, glükokortikoid által indukált izomsorvadást magyarázhatja.

A keringő *hsa-miR-27a* szintjét a 2. típusú cukorbetegséggel is összefüggésbe hozták, illetve az éhomi vércukorértékek fenntartásában is szerepet játszhat (Karolina és mtsai 2012). Tekintettel arra, hogy a glükokortikoidok szerepe az inzulirezisztencia patogenezisében ismert (Geer és mtsai 2012), ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *hsa-miR-27a* kifejeződésében az ACTH és a glükokortikoidok hatására bekövetkezett változások számos más kórkép patogenezisében is szerepet kaphatnak, mindenekelött hyperkortizolizmus esetében, de ezen változások kórlélettani jelentőségének tisztázásához további vizsgálatokra van szükség.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az egészséges egyének vérében keringő mikroRNS-ek vizsgálata kapcsán a tumor szupresszor mikroRNS-ek, relatív túlsúlyát figyeltük meg, és ezek alapján felvetettük, hogy ezen mikroRNS-ek az epigenetikai információ közvetítésével a sejtek malignus átalakulását gátolják, ezáltal részt vehetnek a szervezet tumor felügyeleti rendszerében (tumor surveillance).
2. A mikroRNS-ek szövetspecifikus hatása szintén a daganatképződést gátló védelmi mechanizmus részét képezheti.
3. A hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengelyt érintő hormonvizsgálatok (ACTH és Dexametazon) során igazoltuk a keringő *hsa-miR-27a* kifejeződésének megváltozását *in vivo* emberben.
4. A Dexametazon *in vitro* is fokozta a szekretált *hsa-miR-27a* szintjét mellékvesekéreg-carcinoma sejtek felülűsójában.
5. A mellékvesekéreg rosszindulatú daganatában jelenleg legígéretesebb keringő mikroRNS marker a *hsa-miR-483-5p* szintjét a hormonkezelések nem befolyásolták, ami annak potenciális biomarkerként történő használhatóságát alátámasztja.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

PhD munkám során a keringésben jelen levő mikroRNS-ek szerepét tanulmányoztam. Egészséges egyének vérében elsősorban tumor szupresszor hatású mikroRNS-ek keringenek nagyobb mennyiségben. *In silico* vizsgálati eredményeink és az irodalomban közölt megfigyelések felhasználásával új hipotézist állítottam fel. Az egészséges egyénekben felülreprezentált, döntően tumor szupresszor hatású keringő mikroRNS-ek a daganatképződés folyamatos gátlása útján tumor felügyeleti mechanizmusban vehetnek részt, így a mikroRNS-ek által megvalósuló tumorfelügyelet a szervezet immunrendszerével együttműködve láthatja el a szervezet daganatképződéssel szembeni védekezését.

A keringő mikroRNS szintjét számos élettani és patológiai folyamat befolyásolhatja. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely működésében szerepet játszó hormonok és a mellékvesekéreggel összefüggésbe hozott mikroRNS-ek közötti kapcsolat nem tisztázott. Munkám második részében öt mikroRNS (a *hsa-miR-27a*, a *hsa-miR-200b*, a *hsa-miR-214*, a *hsa-miR-483-5p* és a *hsa-miR-503*) expressziós változásait vizsgáltam Dexametazon és az ACTH hatására *in vivo*, humán plazmamintákban valós idejű reverz transzkripció PCR alkalmazásával. Megállapítottam, hogy a vizsgált öt mikroRNS közül csak a keringő *hsa-miR-27a* kifejeződése változott meg szignifikánsan a hormonális kezelések hatására: kifejeződése Dexametazon hatására nőtt, ugyanakkor ACTH hatására csökkent. NCI-H295R mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalon végzett vizsgálataim azt igazolták, hogy a *szekretált hsa-miR-27a* szintje Dexametazon hatására szignifikánsan nőtt *in vitro*. A mellékvesekéreg carcinoma diagnózisára javasolt keringő *hsa-miR-483-5p* kifejeződését a hormonális kezelések nem befolyásolták, támogatva a fenti mikroRNS diagnosztikai markerként történő alkalmazását. A *hsa-miR-27a* kifejeződése ugyanakkor a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely működésében szerepet játszó hormonok hatására szignifikánsan megváltozik, *in vitro* és *in vivo* egyaránt. Fenti megfigyelésem a keringő mikroRNS-ek és hormonok kapcsolatának egy új távlatát vetíti előre.

8. SUMMARY

In my PhD thesis work, I have focused on studying the role of circulating microRNAs. In the blood of healthy individuals, a relative abundance of microRNAs with predominant tumor suppressor activity was revealed. Based on our own bioinformatics analysis together with studies of literature data I have suggested a novel hypothesis regarding the role/function of circulating microRNAs. These microRNAs may serve in a tumor surveillance mechanism exerting continuous inhibition on tumor formation. The microRNA-mediated tumor surveillance might complement the cancer immune surveillance.

The concentration of microRNAs in blood is influenced by several physiological and pathological conditions. The interaction of hormones of the pituitary-adrenal axis and adrenal cortex-associated circulating microRNAs is mostly unknown. Therefore, I have studied the effects of dexamethasone and adrenocorticotropin on the expression of five (*hsa-miR-27a*, *hsa-miR-200b*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-483-5p*, and *hsa-miR-503*) circulating microRNAs *in vivo* in human plasma samples using real-time reverse transcription PCR method. I have established that only circulating *hsa-miR-27a* from the 5 analyzed microRNAs has been significantly modulated *in vivo* by hormonal treatments: its expression was up-regulated by dexamethasone whereas it was suppressed by adrenocorticotropin. Secreted *hsa-miR-27a* was significantly induced by dexamethasone *in vitro* in NCI-H295R adrenocortical carcinoma cells, as well. The expression of *hsa-miR-483-5p* proposed as a diagnostic marker for adrenocortical malignancy was not affected by dexamethasone or tetracosactide administration supporting its diagnostic application. However, the expression of *hsa-miR-27a* significantly changed by hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis both *in vitro* and *in vivo*. These observations might open a new perspective in the interactions between hormones and microRNAs.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. (2010) Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 56: 1183-1185.

Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrunaro A, Gerace D, Musolino C. (2012) Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol*, 41: 1897–1912.

Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*, 29: 341-345.

Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. (2010) miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ*, 17: 215-220.

Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M, Zhang C, Tran N, Fan H, Retzlaff K, Bittner A, Raponi M. (2009) Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, 9: 374.

Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.

Bartel DP. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136: 215-233.

Baskerville S, Bartel DP. (2005) Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11: 241-247.

Baier SR, Nguyen C, Xie F, Wood JR, Zemleni J. (2014) MicroRNAs are absorbed in

biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J Nutr*, 144: 1495-1500.

Bentwich I, Avniel A, Karov Y., Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, 37: 766-770.

Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. (2005) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*; 120: 21-24.

Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M, Lopez I, Javier Sola J, Alonso MM, Fortes P, Garcia-Foncillas J (2011) MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*, 29: 1661-1671.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13: 1097-1101.

Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. (2010) The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 17: F19-36.

Butz H, Liko I, Czirjak S, Igaz P, Korbonits M, Balint K, Racz K, Patocs A. (2010) Downregulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNAs in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*; 95: E181-191.

Butz H., Likó I., Czirják S., Igaz P, Korbonits M, Rác K, Patócs A. (2011) MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*, 14: 112-124.

- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 15524-15529.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 2999-3004.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med*, 353: 1793-1801.
- Cao J, Cai J, Huang D, Han Q, Yang Q, Li T, Ding H, Wang Z. (2013) miR-335 represents an invasion suppressor gene in ovarian cancer by targeting Bcl-w. *Oncol Rep* 30: 701-706.
- Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, De Vere White R, Evans CP, Fussel S, Hamdy FC, Kallioniemi O, Mengual L, Schlomm T, Visakorpi T. (2011) MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol*, 59: 671-681.
- Chabre O, Libé R, Assie G, Barreau O, Bertherat J, Bertagna X, Feige JJ, Cherradi N. (2013) Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients, *Endocr Relat Cancer*, 20: 579-594.

- Chen CZ. (2005) MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*, 353: 1768-1771.
- Chen G, Wang J, Cui Q. (2013) Could circulating miRNAs contribute to cancer therapy? *Trends Mol Med*, 19: 71-73.
- Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. (2012) The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 222: 314-323.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18: 997-1006.
- Chiba M., Kimura M., Asari S. (2012) Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. *Oncol Rep*, 28: 1551-1558.
- Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. (2008) Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*, 54: 482-490.
- Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH. (2010) p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ*, 17: 236-245.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ,

Negrini M, Croce CM. (2005) miR-15 and miR16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13944-13949.

Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. (2010) Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 3: 499-506.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA (2011) MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*, 8: 467-477.

Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Kelly D, Collignon O, Ng LL, Wagner DR, Squire IB. (2013) A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction. *PloS One*, 8: e70644.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3: 991-998.

El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. (2008) miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 57: 2708-2717.

Etheridge A, Gomes CP, Pereira RW, Galas D, Wang K. (2013) The complexity, function and applications of RNA in circulation. *Front Genet*, 4:115.

Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H, Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM. (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: E2110-E2116.

- Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Croce CM. (2013) A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors. *RNA Biol*, 10, 169-174.
- Faller M, Guo F. (2008) MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta*, 1779: 663-667.
- Fassnacht M., Kroiss M., Allolio B. (2013) Update in adrenocortical carcinoma, *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 4551-4564.
- Fernandez PC, Frank SR, Wang LQ, Schroeder M, Liu SX, Greene J, Cocito A, Amati B. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*, 17: 1115-1129.
- Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X, Christenson LK. (2008) Hormonal regulation of microRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Reprod*, 79: 1030-1037.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9: 102-114.
- Finn NA, Searles CD. (2012) Intracellular and Extracellular miRNAs in Regulation of Angiogenesis Signaling. *Curr Angiogenesis*, 4: 299-307.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Formosa A, Markert EK, Lena AM, Italiano D, Finazzi-Agro E, Levine AJ, Bernardini S, Garabadgiu AV, Melino G, Candi E. (2013) MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495

and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene*, 33: 5173-5182.

Forte S, La Rosa C, Pecce V, Rosignolo F, Memeo L. (2015): The role of microRNAs in thyroid carcinomas. *Anticancer Res*, 35: 2037-2047.

Geer EB, Islam J, Buettner C. (2014) Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 43: 75-102.

Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. (2008) Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 3: e3148.

Gits CM, van Kuijk PF, Jonkers MB, Boersma AW, Smid M, van Ijcken WF, Coindre JM, Chibon F, Verhoef C, Mathijssen RH, den Bakker MA, Verweij J, Sleijfer S, Wiemer EA (2014) MicroRNA expression profiles distinguish liposarcoma subtypes and implicate miR-145 and miR-451 as tumor suppressors. *Int J Cancer*, 135: 348-361.

Glasgow SM, Laug D, Brawley VS, Zhang Z, Corder A, Yin Z, Wong ST, Li XN, Foster AE, Ahmed N, Deneen B. (2013) The miR-223/nuclear factor I-A axis regulates glial precursor proliferation and tumorigenesis in the CNS. *J Neurosci*, 33: 13560-13568.

Godlewski J, Bronisz A, Nowicki MO, Chiocca EA, Lawler S. (2010) microRNA-451: A conditional switch controlling glioma cell proliferation and migration. *Cell Cycle*, 9: 2742-2748.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36: D154-158.

- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27: 91-105.
- György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. (2012) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011, 68: 2667-2688.
- Hamai A, Benlalam H, Meslin F, Hasmim M, Carre T, Akalay I, Janji B, Berchem G, Noman MZ, Chouaib S. (2010) Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune? *Tissue Antigens*, 75: 1-8.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LA, Masters SL (2013) miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med*, 274: 215-226.
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa KS, Tomida Y, Yatabe K, Kawahara Y, Takahashi T. (2005) A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 65: 9628-9632.
- He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. (2005) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 19075-19080.

- He L, Hannon GJ. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5: 522-531.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435: 828-833.
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447: 1130-1134.
- Heegaard NH, Schetter AJ, Welsh JA, Yoneda M, Bowman ED, Harris CC. (2012) Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*, 130: 1378-1386.
- Hon LS, Zhang Z. (2007) The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome Biol*, 8: R166.
- Hong L, Han Y, Zhang Y, Zhang H, Zhao Q, Wu K, Fan D. (2013) MicroRNA-21: a therapeutic target for reversing drug resistance in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 17: 1073-1080.
- Hu Z, Shen WJ, Kraemer FB, Azhar S. (2012) MicroRNAs 125a and 455 repress lipoprotein-supported steroidogenesis by targeting scavenger receptor class Btype I in steroidogenic cells. *Mol Cell Biol* 32: 5035-5045.
- Hu Z, Shen WJ, Cortez Y, Tang X, Liu LF, Kraemer FB, Azhar S. (2013) Hormonal regulation of MicroRNA expression in steroid producing cells of the ovary, testis and adrenal gland. *PLoS One*, 8: e78040.

- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 3: e3694.
- Jarry J, Schadendorf D, Greenwood C, Spatz A, van Kempen LC. (2014) The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions. *Mol Oncol*, 8: 819-829.
- Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. (2008) Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 451: 1125-1129.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120: 635-647.
- Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, Quintana JF, Nimmo ER, Buck AH, Satsangi J. (2015) MicroRNAs: new players in IBD. *Gut*, 64: 504-513.
- Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. (2012) Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: E2271-2276.
- Kim J. H, Jin H. O, Park J. A, Chang Y. H, Hong Y. J, Lee J. K. (2014) Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. *SpringerPlus*, 3, article 76, 1-5

- Kogure T, Lin WL, Yan I.K, Braconi C, Patel T. (2011) Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*.;54:1237–1248.
- Krek A, Grun D, Poy M.N, Wolf R, Rosenberg L, Epstein E.J, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus K.C, Stoffel M, Rajewsky N. (2005) Combinatorial microRNA target predictions *Nat Genet*, 37: 495–500.
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*.141:, 672–675.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *EMBO J*, 23: 4051-4060.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115: 787-798.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120: 15-20.
- Li H, Xie S, Liu M, Chen Z, Liu X, Wang L, Li D, Zhou Y (2014) The clinical significance of downregulation of mir-124-3p, mir-146a-5p, mir-155-5p and mir-335-5p in gastric cancer tumorigenesis. *Int J Oncol* 45:197-208.
- Liang Z, Wu H, Xia J, Li Y, Zhang Y, Huang K, Wagar N, Yoon Y, Cho HT, Scala S, Shim H. (2009) Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast

cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein
Biochem Pharmacol 79, 817–824

Liu D, Liu C, Wang X, Ingvarsson S, Chen H. (2014) MicroRNA-451 suppresses tumor cell growth by down-regulating IL6R gene expression. *Cancer Epidemiol* 38:85-92.

Luo X, Tsai LM, Shen N, Yu D. (2010) Evidence for microRNA-mediated regulation in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 69: i30-36.

Ma R, Jiang T, Kang X. (2012) Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res* 31:38. doi:10.1186/1756-9966-31-38

McFarlane C, Vajjala A, Arigela H, Lokireddy S, Ge X, Bonala S, Manickam R, Kambadur R, Sharma M. (2014) Negative auto-regulation of myostatin expression is mediated by Smad3 and microRNA-27, *PloS One*, 9:, pp. e87687.

Malumbres M. (2013) miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Mol Aspects Med*; 34: 863–874.

Melnik BC, John SM, Schmitz G. (2014) Milk: an exosomal microRNA transmitter promoting thymic regulatory T cell maturation preventing the development of atopy? *J Transl Med* 12:43.

Melnik BC. (2015) The pathogenic role of persistent milk signaling in mTORC1- and milk- microRNA-driven type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rev* 11: 46-62

Mendell JT. (2008) miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*; 133:217-222.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher

- CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10513-10518.
- Murri M, Insenser M, Fernandez-Duran E, San-Millan J.L, Escobar-Morreale H.F (2013) Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 98:E1835-1844.
- Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JP.(2012) Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. *Natl Cancer Inst.* 104: 528–540
- Namlos HM, Meza-Zepeda LA, Baroy T, Ostensen IH, Kresse SH, Kuijjer ML, Serra M, Burger H, Cleton-Jansen AM, Myklebost O. (2012) Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs. *PloS one* 7 (10):e48086.
- Negrini M., Nicoloso M. S., Carlin G.A. (2009) Micro-RNAs and cancer – New paradigmas in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol* 21: 470-479
- Nian W, Ao X, Wu Y, Huang Y, Shao J, Wang Y, Chen Z, Chen F, Wang D. (2013) miR-223 functions as a potent tumor suppressor of the Lewis lung carcinoma cell line by targeting insulin-like growth factor-1 receptor and cyclin-dependent kinase 2. *Oncol Lett* 6: 359-366.
- Nicholson AW. (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* 23: 371-390.
- Nishi H, Ono K, Iwanaga Y, Horie T, Nagao K, Takemura G, Kinoshita M, Kuwabara Y, Mori RT, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. (2010) MicroRNA-15b modulates cellular ATP levels and degenerates mitochondria via Arl2 in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 285: 4920-4930.

- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 10: 111-122.
- O'Donnell K.A, Wentzel E.A, Zeller K.I, Dang C.V, Mendell J.T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression *Nature* 435: 839–843
- Özata DM, Caramuta S, Velazquez-Fernandez D, Akcakaya P, Xie H, Hoog A, Zedenius J, Backdahl M, Larsson C & Lui WO. (2011) The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 18: 643-655.
- Patel D, Boufraquech M, Jain M, Zhang L, He M, Gesuwan K, Gulati N, Nilubol N, Fojo T, Kebebew E. (2013) MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery* 154: 1224–1228.
- Patrick DM, Zhang CC, Tao Y, Yao H, Qi X, Schwartz RJ, Jun-Shen Huang L, Olson EN. (2010) Defective erythroid differentiation in miR-451 mutant mice mediated by 14-3-3zeta. *Genes Dev* 24: 1614-1619.
- Patterson E.E, Holloway A.K, Weng J, Fojo T, Kebebew E. (2011) MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy, *Cancer*, 117: 1630-1639.
- Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M. (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)*., 5:492-497.
- Rayner KJ, Hennessy EJ. (2013) Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. *Journal of Lipid Res* 54:1174-1181.

- Redis RS, Calin S, Yang Y, You MJ, Calin GA. (2012) Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy. *Pharmacol Ther* 136:169–174.
- Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. (2011) Circulating microRNAs: association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol/Hematol* 80:193–208.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110: 513-520.
- Riester A, Issler O, Spyroglou A, Rodrig SH, Chen A, Beuschlein F. (2012) ACTH-dependent regulation of microRNA as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland. *Endocrinology*, 153:212-222.
- Roncarati R, Viviani Anselmi C, Losi MA, Papa L, Cavarretta E, Da Costa Martins P, Contaldi C, Sacconi Jotti G, Franzone A, Galastri L, Latronico MV, Imbriaco M, Esposito G, De Windt L, Betocchi S, Condorelli G. (2014) Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 63:, 920-927.
- Ryan BM, Robles AI, Harris CC. (2010) Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*, 10: 389–402.
- Salmanidis M, Pillman K, Goodall G, Bracken C. (2014) Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs. *Int J Biochem Cell Biol*; 54: 304–11.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.*, 5: R13.

- Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. (2006) Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*, 17:189-202.
- Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Laukoa, Mlync̆ek M. (2009) Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol* 219: 415–420.
- Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. (2005) Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci.* , 21:1469-77.
- Snow JW, Hale AE, Isaacs SK, Baggish AL, Chan SY. (2013) Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA Biol* 10:1107-1116.
- Song E, Lee SK, Wang J , Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. (2003) RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.*;9: 347-351
- Song C.Z, Tian X, Gelehrter T.D (1999) Glucocorticoid receptor inhibits transforming growth factor-beta signaling by directly targeting the transcriptional activation function of Smad3, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, :11776-11781.
- Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB. (2009) miR-195 and miR-483-5p identified as predictors of poor prognosis in adrenocortical cancer. *ClinCancer Res*, 15, 7684-7692.
- Sun Z, Zhang Z, Liu Z, Qiu B, Liu K, Dong G. (2014) MicroRNA-335 inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting ZEB2. *Med Oncol* 31:982. doi:10.1007/s12032-014-0982-8

- Szabo DR, Luconi M, Szabo PM, Toth M, Szucs N, Horanyi J, Nagy Z, Mannelli M, Patocs A, Racz K, Igaz P. (2014) Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. *Lab Invest* 94:331-339.
- Tahiri A, Leivonen SK, Luders T, Steinfeld I, Ragle Aure M, Geisler J, Makela R, Nord S, Riis ML, Yakhini Z, Kleivi Sahlberg K, Borresen-Dale AL, Perala M, Bukholm IR, Kristensen VN. (2014) Deregulation of cancer-related miRNAs is a common event in both benign and malignant human breast tumors. *Carcinogenesis* 35:76-85.
- Takahashi K, Yokota S, Tatsumi N, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. (2013) Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicology and Appl Pharmacol* 272:154-160.
- Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. (2015) The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 7:598-616.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival *Cancer Res.* 64: 3753–3756
- Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, Kuroda M. (2009) Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PloS one* 4:e5532. doi:10.1371/journal.pone.0005532
- Taylor DD, Gercel-Taylor C. (2013) The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet* 4:142. doi:10.3389/fgene.2013.00142

- Terzolo M, Daffara F, Ardito A, Zaggia B, Basile V, Ferrari L, Berruti A. (2013) Management of adrenal cancer: a 2013 update. *J Endocrinol Invest*, 37: 207-217.
- Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, Patócs A, Likó I, Gaillard RC, Falus A, Rác K, Igaz P. (2009): Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat. Cancer*, 16: 895-906
- Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. (2008) Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 79: 581-588.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee J.J, Lotvall J.O.(2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*;9: 654–659.
- Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. (2010) Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*, 31: 659-666.
- Wang J, Tian X, Han R, Zhang X, Wang X, Shen H, Xue L, Liu Y, Yan X, Shen J, Mannoor K, Deepak J, Donahue JM, Stass SA, Xing L, Jiang F. (2014) Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer. *Oncogene* 33: 1181-1189.
- Wang Y, Zhao W, Fu Q. (2013) miR-335 suppresses migration and invasion by targeting ROCK1 in osteosarcoma cells. *Mol Cell Biochem*, 384: 105-111.

- Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. (2006) A limited set of human microRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3584-3591.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56:1733-1741.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862
- Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R, Mihailovic A, Brown M, Rosenwaks Z, Tuschl T. (2013) Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 4255-4260.
- Witwer KW, Hirschi KD. (2014) Transfer and functional consequences of dietary microRNAs in vertebrates: concepts in search of corroboration: negative results challenge the hypothesis that dietary xenomiRs cross the gut and regulate genes in ingesting vertebrates, but important questions persist. *BioEssays*,;36: 394-406.
- Wu WK, Lee CW, Cho CH, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JJ. (2010) MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game. *Oncogene*, 29: 5761–5771.
- Xu H, Mei Q, Shi L, Lu J, Zhao J, Fu Q. (2014) Tumor-Suppressing Effects of miR451 in Human Osteosarcoma. *Cell Biochem Biophys*,;69:163-168.
- Yao N, Yang BQ, Liu Y, Tan XY, Lu CL, Yuan XH, Ma X. (2010) Follicle-stimulating hormone regulation of microRNA expression on progesterone cultured rat granulosa cells. *Endocrine*, 38: 158–166.

- Zhang Q, Sun H, Jiang Y, Ding L, Wu S, Fang T, Yan G, Hu Y. (2013) MicroRNA-181a suppresses mouse granulose cell proliferation by targeting activin receptor IIA. PLoS ONE 8: e59667.doi:10.1371/journal.pone.0059667.
- Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X, Yin Y, Wang C, Zhang T, Zhu D, Zhang D, Xu J, Chen Q, Ba Y, Liu J, Wang Q, Chen J, Wang J, Wang M, Zhang Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. (2012) Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. Cell Res 22: 107-126.
- Zhang L, Pickard K, Jenei V, Bullock MD, Bruce A, Mitter R, Kelly G, Paraskeva C, Strefford J, Primrose J, Thomas GJ, Packham G, Mirnezami AH. (2013) miR-153 supports colorectal cancer progression via pleiotropic effects that enhance invasion and chemotherapeutic resistance. Cancer Res, 73: 6435–6447
- Zhao LY, Yao Y, Han J, Yang J, Wang XF, Tong DD, Song TS, Huang C, Shao Y (2014) miR-638 Suppresses Cell Proliferation in Gastric Cancer by Targeting Sp2. Dig Dis Sci, 59: 1743-1753
- Zhou W., Fong M.Y., Min Y., Somlo G., Liu L., Palomares M.R.(2014) Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. Cancer Cell, 25: 501–515.
- Zhu DX, Zhu W, Fang C, Fan L, Zou ZJ, Wang YH, Liu P, Hong M, Miao KR, Liu P, Xu W, Li JY. (2012) miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. Carcinogenesis, 33: 1294-1301.

**10. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK
JEGYZÉKE**

1. **Igaz I, Igaz P.** (2014) Tumor surveillance by circulating microRNAs: a hypothesis. *Cell Mol Life Sci*,71:4081-4087. **IF (2014): 5,808**
2. **Igaz I, Nyíró G, Nagy Z, Butz H, Nagy Z, Perge P, Sahin P, Tóth M, Rác K, Igaz P, Patócs A.** (2015) Analysis of circulating microRNAs in vivo following administration of dexamethasone and adrenocorticotropin. *Int J Endocrinol*, 2015: 589230. doi: 10.1155/2015/589230. **IF (2014): 1,948**
3. **Igaz I, Igaz P.** (2015) Possible role for microRNAs as inter-species mediators of epigenetic information in disease pathogenesis: is the non-coding dark matter of the genome responsible for epigenetic interindividual or interspecies communication? *Med Hypotheses*, 84: 150-154. **IF (2014): 1,074**
4. **Igaz I, Igaz P.** (2015) Why is microRNA action tissue specific? A putative defense mechanism against growth disorders, tumor development or progression mediated by circulating microRNA? *Med Hypotheses*, 85: 530-533. **IF (2014): 1.074**
5. Perge P, Nagy Z, **Igaz I, Igaz P.** (2015): Suggested roles for microRNA in tumors. *Biomol Concepts*, 6: 149-155.
6. Igaz P, **Igaz I, Nagy Z, Nyíró G, Szabó PM, Falus A, Patócs A, Rác K.** (2015) MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell Mol Life Sci*, 72: 417-428. **IF (2014): 5,808**

11. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Igaz I**, Szőnyi M, Varga P, Topa L. (2014) A mikro-RNS-ek szerepe a gyulladássos bélbetegségek diagnosztikájában. Orv Hetil, 155: 487-491.
2. **Igaz I**, Topa L. (2014) A testváladékok mikro-RNS-kifejeződésének jelentősége a gyomor-bél rendszeri tumorok diagnosztikájában. Orv Hetil, 155: 11-15.
3. Igaz P, **Igaz I**, Rác K, Tulassay Z. (2006) Az endokrin pancreas öröklődő daganatai. Orv Hetil, 147: 195-200.
4. Igaz P, Müllner K, Hargitai B, **Igaz I**, Tömböl Z, Rác K, Tulassay Z. (2007) Marked chromogranin A elevation in a patient with bilateral adrenal incidentalomas, and its rapid normalization after discontinuation of proton pump inhibitor therapy. [Letter to the Editor] Clin Endocrinol, 67: 805-806.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni a munkám elvégzéséhez nyújtott segítségükért:

-témavezetőmnek: **Dr. Patócs Attila** egyetemi docensnek a kutatómunka elvégzésében nyújtott segítségéért, hasznos tanácsaiért és támogatásáért

-**Prof. Rácz Károly** programvezetőnek, a II. Belgyógyászati Klinika nemrégiben leköszönt igazgatójának, a Semmelweis Egyetem Doktori Tanács elnökének

-**Dr. Topa Lajos** Főorvos Úrnak, hogy engedélyezte a kutató munkát

-**Dr. Nyíró Gábor** tudományos munkatársnak, a laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért

-**Dr. Szabó Péter Mártonnak** (Biometric Research Branch, Division of Cancer Treatment, and Diagnosis, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) a keringő mikroRNS-ek bioinformatikai elemzésében nyújtott segítségéért

-**Dr. Nagy Zoltán** PhD hallgatónak, és a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Molekuláris Endokrinológiai Laboratóriuma összes PhD hallgatójának és dolgozójának.

- és bátyámnak, **Dr. Igaz Péternek** a cikkek megírásában nyújtott segítségéért.